VALERIU RUSU
TRAIAN BARAN DUMITRU D. BRĂNIŞTEANU

BIOMEMBRANE ŞI PATOLOGIE

1

EDITURA MEDICALĂ

Scanned with OKEN Scanner

VALERIU RUSU
Doctor în științe medicale
Șef de lucrări – Disciplina
de Biofizică medicală
I.M.F. Iași

TRAIAN BARAN
Doctor în științe medicale
Profesor – Disciplina
de Biofizică medicală
I.M.F. Iași

DUMITRU D. BRĂNIȘTEANU
Doctor în științe medicale
Șef de lucrări – Disciplina
de Fiziologie
I.M.F. Iași

BIOMEMBRANE ȘI PATOLOGIE

Vol. I

EDITURA MEDICALĂ,
București, 1988

Scanned with OKEN Scanner

Coperta de: GICĂ PETRE

MOTO: *"... Astfel, medicul va trebui să studieze nu numai ştiinţa boalelor ş-a vindecării, ci şi ştiinţele naturale, anatomia şi fiziologia, mai departe chimie şi botanică şi mai departe fizică şi matematică şi iarăşi într-altă parte din filosofie-psihologia şi logica ş.a.m.d. Cum că această întindere a inteligenţei din cercul ei propriu din ce în ce mai departe în cele învecinate nu are o absolută măsură de determinare este evident, îndată ce recugetăm că toate ştiinţele stau într-o legătură, ca o reţea şi cum că fără o singură săritură putem propăşi din fiecare punct al ştiinţei pînă la totalitatea ei".*

(M. Eminescu — manuscrisul 2255, fila 240—241).

Scanned with OKEN Scanner

Cuprins

I — INTRODUCERE. p. 5

II — SCURT ISTORIC AL EVOLUȚIEI CUNOAȘTERII BIOMEMBRANELOR, p. 12

III — COMPOZIȚIA BIOCHIMICĂ ȘI ORGANIZAREA MOLECULARĂ A BIO- — MEMBRANELOR, p. 27: 1. Lipidele membranare, p. 29 • 2. Proteinele de la nivelul membranei, p. 46 • 3. Apa și ionii de la nivelul biomembranelor, p. 56 • 4. Modelul mozaicului fluid al biomembranelor, p. 57

IV — TRANSPORTUL PRIN MEMBRANELE BIOLOGICE, p. 63: 1. Tipuri de transport, p. 65 • 2. Transportul pasiv, p. 68 • 3. Transportul activ, p. 76 4. Transportul direct al macromoleculelor, p. 87 • 5. Transportul prin vezicule, p. 87

V — SISTEMELE DE COMUNICARE INTERCELULARĂ; RECEPTORII MEMBRANARI, p. 93: 1. Modalități de comunicare intercelulară, p. 94 • 2. Componentele moleculare ale sistemelor de comunicare intercelulară, p. 96 • 3. Receptorii membranari — date normale și patologice, p. 111

VI — CITOSCHELETUL NORMAL ȘI PATOLOGIC, p. 144: 1. Structura moleculară a filamentelor și a rețelei microtrabeculare, p. 147 • 2. Organizarea moleculară și dinamica citoscheletului, p. 156 • 3. Particularități ale citoscheletului la o serie de tipuri celulare, p. 159 • 4. Funcțiile citoscheletului, p. 162 • 5. Patologia moleculară prin modificări ale citoscheletului, p. 168

VII — MEMBRANA ERITROCITARĂ — ASPECTE NORMALE ȘI PATOLOGICE, p. 176: 1. Compoziția biochimică a membranelor eritrocitare, p. 178 • 2. Citoscheletul sau scheletul membranei eritrocitare, p. 198 • 3. Organizarea structurală a membranei eritrocitare p. 207 • 4. Transportul prin membrana eritrocitară, p. 215 • 5. Forma, deformabilitatea și agregarea eritrocitară, p. 235 • 6. Interacțiunile hemoglobină-membrană eritrocitară, p. 254 • 7. Membrana eritrocitară în patologie, p. 256

VIII — MEMBRANELE ÎN NEUROPATOLOGIE, p. 285: 1. Date selective privind funcționalitatea membranelor excitabile (neuronale, musculare), p. 286 • 2. Mecanisme membranare în patologia neuromusculară, p. 296 • 3. Mecanisme membranare în patologia sistemului nervos central, p. 330

IX — ROLUL MEMBRANELOR BIOLOGICE ÎN PROCESELE DE ÎMBĂTRÎNIRE, p. 343: 1. Teorii asupra procesului de îmbătrînire, p. 343 • 2. Teoria de membrană a îmbătrînirii, p. 348 • 3. Biomarcheri ai îmbătrînirii, p. 363

Scanned with OKEN Scanner

IX — MODIFICĂRI ALE BIOMEMBRANELOR ÎN ALCOOLISM, p. 375: 1. Efectele etanolului asupra proprietăților lipidelor din membrană, p. 376 • 2. Modificări ale compoziției lipidelor membranare, p. 380 • 3. Efectele alcoolului asupra membranelor neuronale, p. 383 • 4. Alte efecte moleculare ale alcoolului etilic, p. 390

XI — ALTERĂRI STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE SUPRAFEȚEI CELULARE ÎN CANCER, p. 395: 1. Rolul biomembranelor în cancerogeneză, p. 396 • 2. Alterări ale microanatomiei suprafeței celulare, p. 401 • 3. Modificări ale lipidelor și ale fluidității membranei, p. 402 • 4. Modificări ale glicolipidelor p. 407 • 5. Alterările diferitelor proteine ale suprafeței celulare, p. 410 • 6. Modificările citoscheletului la nivelul celulelor canceroase, p. 416 • 7. Moleculele suprafeței celulare și metastazele, p. 425 • Indice de termeni, p. 433

Scanned with OKEN Scanner

I. Introducere

Interesul excepţional acordat cercetării structurii şi funcţiilor biomembranelor, în condiţii normale şi patologice, se materializează printr-o creştere exponenţială a numărului de publicaţii. În această situaţie, dominarea tuturor datelor tipărite ar deveni posibilă doar într-o singură ipostază, utopică: dacă toate creierele cercetătorilor din domeniu s-ar uni, împreună cu computerele ce stochează informaţia referitoare la biomembrane! De aceea, obiectivul esenţial pe care ni l-am propus nu este o prezentare exhaustivă de date, ci realizarea unei introduceri într-un domeniu care deschide calea explicării la nivel molecular a unor procese fiziologice şi patologice. Aceasta cu speranţa că ea va fi utilă medicilor practicieni şi studenţilor în medicină.

Expansiunea volumului de informaţii are şi o consecinţă ce trebuie semnalată: a trecut vremea prezentărilor „confortabile", nu mai este posibilă o abordare liniară a subiectelor decît cu riscul unui reducţionism care se depărtează de imaginea reală a fenomenelor. Pe un plan mai larg, cunoaşterea nu se mai exprimă într-o singură direcţie conducătoare, ci într-o reţea complexă care trebuie sesizată pentru integrarea datelor cunoscute asupra materiei şi a vieţii. Am precizat aceasta nu pentru a sugera un amendament la insuficienta claritate a unora din paginile acestei cărţi, ci pentru recunoaşterea unei realităţi ce nu trebuie ignorată.

Situîndu-ne pe aceeaşi linie, a unor constatări de principiu, rezultatele concrete exprimate în domeniul practicii medicale nu sînt, încă, pe măsura avansului extraordinar în cunoaşterea membranelor biologice. Aceasta, în condiţiile în care se recunoaşte că nu există boală fără implicarea indirectă sau directă a membranelor celulare. De altfel, decalajul considerabil între rezultatele excepţionale obţinute în unele laboratoare de cercetare şi reflectarea acestor rezultate în progresul real al medicinii se observă nu numai în cazul biomembranelor, ci pe un plan mai larg, în ansamblul datelor referitoare la biologia moleculară a celulelor. Evoluţia incomparabil mai rapidă a cercetării fundamentale a condus la recunoaşterea unei „crize" (printre atîtea altele) în aplicarea rezultatelor obţinute. Soluţiile prin care să se obţină reducerea acestui decalaj între fundamental şi aplicativ sînt deocamdată incerte. Neîndoielnic, devin necesare reconsiderări esenţiale de ordin conceptual. Astfel,

Scanned with OKEN Scanner

în opinia noastră relația dintre biomembrane și patologie trebuie evaluată la importanța sa reală comparînd-o cu singurul domeniu cu adevărat revoluționat de cercetarea fundamentală, genetica medicală. Numărul bolilor cu determinism genetic, mai mult sau mai puțin atestat, depășește 6000, tinzînd să cuprindă cea mai mare parte a patologiei. În aceste condiții, poate apărea impresia că genetica reprezintă singura cale majoră în elucidarea patologiei umane, adevăr care trebuie examinat luînd în considerare două aspecte. Primul conține o realitate eludată frecvent, iar al doilea reprezintă un argument de ordin pragmatic. Referindu-ne la primul aspect, în explicarea organizării sistemelor vii conceptele geneticii nu sînt suficiente. Aceasta se poate demonstra pentru ambele grupe de molecule ale membranei, proteine și lipide. În cazul unei proteine doar structura primară, succesiunea aminoacizilor în lanțul polipeptidic, este codificată genetic. Dispoziția spațială a componentelor, determinant major al funcțiilor proteinei respective, este consecința anumitor legi biofizice, o macromoleculă avînd configurația ce corespunde unui minim de energie potențială pentru temperatura corpului și mediul apos în care se află. Determinismul genetic prezintă deci limite, iar explicațiile trebuie continuate cu datele rezultate din legile fizice și chimice aplicabile structurilor vii. Date foarte recente ,,complică'' și mai mult acest aspect. Astfel, precizia deosebită a imaginilor obținute prin difracția cu raze X a condus la ideea că structura proteinelor este rigidă, iar atomii ocupă în molecule unii în raport cu alții, poziții fixe. Ca urmare, cea mai mare parte a descrierilor activității proteinelor pornesc de la modele moleculare statice. Este consacrată, de pildă, compararea interacțiunii unei enzime cu molecula substrat, sau a unei molecule ligand cu receptorul specific, drept un mecanism cheie-broască, ori într-o alternativă mai ,,evoluată'', priză-ștecher. Deoarece se cunoaște existența unor modificări conformaționale, de exemplu în cazul hemoglobinei, în momentul fixării oxigenului, s-a acceptat că printr-un mecanism de transformare bruscă este posibilă trecerea dintr-o primă conformație rigidă în alta. În ultimii ani, însă, ca rezultat al utilizării tehnicilor de rezonanță magnetică nucleară și de simulare pe calculatoare, apar tot mai multe date care conduc la concluzia că atomii unei proteine sînt animați, unii în raport cu alții, de mișcări importante, imaginea obținută prin difracția razelor X nefiind decît o reprezentare ,,medie'' foarte relativă, a macromoleculelor. În rezumat, proteinele se deformează fără încetare, iar în cristalele studiate prin difracție X compuse din circa 10^{20} molecule, probabilitatea ca o moleculă să se afle exact în conformația medie la un moment dat, este foarte redusă. Or, cunoașterea poziției medii a atomilor în proteine este de un interes considerabil, ea servind ca bază în descrierea precisă a activității moleculelor, îndeosebi a fenomenelor de cataliză, transport de ioni și transfer de informație, toate produse de predilecție la nivelul biomembranelor. Dacă s-ar accepta în continuare structura mioglobinei așa cum rezultă din modelul actual, întrucît bariera energetică ce se opune fixării oxigenului este de 100 kilocalorii pe mol, s-a calculat că pentru fixarea și eliberarea oxigenului din proteină ar fi necesare mai multe miliarde de ani! Simulînd însă mișcările lanțurilor laterale responsabile de barierele energetice (lanțuri alcătuite din 3 aminoacizi, histidina, treonina și valina) și determinînd energia necesară depărtării lor, s-a constatat că o energie de 8,5 kilocalorii pe mol este suficientă pentru crearea unei deschideri necesare fixării oxigenului și scăderii barierei energetice la circa 5 kilocalorii pe mol. Pentru această deformare energia totală nu este deci 100, ci doar 13,5 kilocalorii pe mol, fapt con-

Scanned with OKEN Scanner

firmat de valorile măsurate experimental. Au şi fost obţinute primele imagini reprezentînd mişcările mioglobinei observate la intervale de 5 picosecunde! Pe imaginile obţinute prin simulare la calculator se constată deplasarea elicelor alfa cu conservarea formei. Am apelat la acest exemplu şi pentru a sugera impactul pe care îl exercită tehnicile actuale din domeniul biofizicii moleculare asupra unor imagini şi explicaţii aparent consacrate.

Revenind la dependenţa relativă de factori genetici a moleculelor ce alcătuiesc membrana, lipidele membranare, de o diversitate excepţională (într-o membrană există cîteva sute de clase moleculare lipidice diferite) nu posedă structura înscrisă în genom decît indirect, prin intermediul enzimelor care le sintetizează. Rolul lipidelor la nivelul biomembranelor nu este, însă, nicidecum secundar (a se vedea cap. III şi VII).

Cele afirmate anterior nu constituie un „atac" împotriva geneticii, care va rămîne mereu una din cheile esenţiale în înţelegerea structurilor vii, fiind şi cea mai evoluată din punct de vedere al metodelor de lucru.

Un al doilea aspect este de ordin practic. Astfel, este posibil ca multe dintre modificările patologice ale biomembranelor să fie consecinţa unei alterări localizate a genomului. S-a demonstrat deja existenţa unor variante genetice de acest gen cu expresia fenotipică exprimată la nivelul membranei eritrocitare sau chiar la nivelul cvasitotalităţii biomembranelor („defect de membrană generalizat") (a se vedea cap. VII, VIII). În aceste cazuri cunoaşterea expresiei fenotipice alterate a biomembranelor, consecinţă a defectelor genetice, este indispensabilă în înţelegerea mecanismelor fiziopatologice. Concomitent, această cunoaştere oferă soluţii terapeutice, deoarece, cel puţin actualmente, accesul la nivelul genomului pentru normalizarea acestuia este mult mai limitat, în raport cu mijloacele de care dispune practica medicală în direcţia temporizării sau întîrzierii alterărilor fenotipului.

Referindu-ne la conţinutul volumului de faţă, vom menţiona că am fost nevoiţi să ne restrîngem numai la *membrana plasmatică* sau *plasmalemă* (denumită, încă, şi membrană periplasmatică, citoplasmatică, sau membrană celulară). În realitate, se ştie că în afara plasmalemei există un întreg sistem de membrane intracitoplasmatice interconectate. Concomitent, deoarece plasmalema se află în relaţii structurale şi funcţionale strînse cu citoscheletul şi glicocalixul, orice disociere a celor trei entităţi este artificială (fig. 1 a şi b).

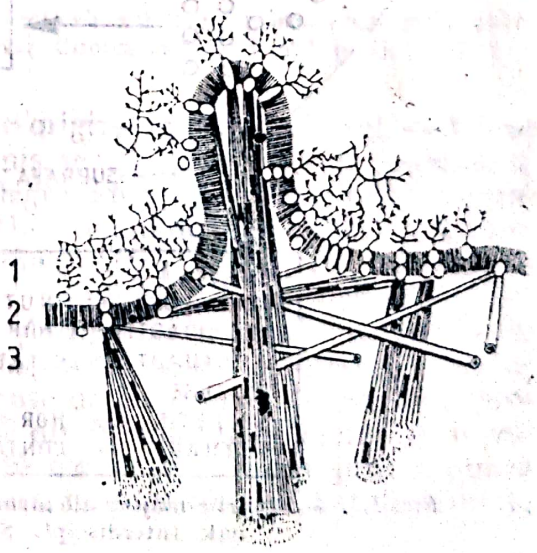


Fig. I. 1—a) Membrana celulară (2), glicocalixul (1) şi citoscheletul (3). (După G. L. Nicolson, Biochim. Biophys. acta, 1976, 457, p. 57).

Scanned with OKEN Scanner

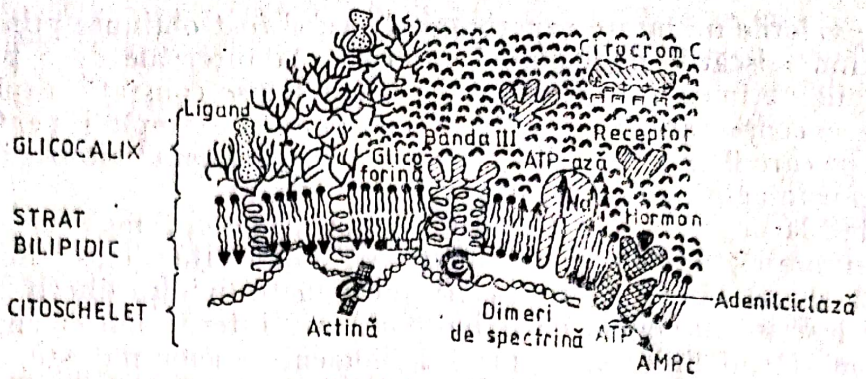


Fig. I. 1 b) Reprezentarea de ansamblu a suprafeței eritrocitare, conținînd integrate o serie de date actuale (după E. Sackmann, din „Synergetics — From Microscopic to Macroscopic Order", Springer-Verlag, 1984, p. 69).

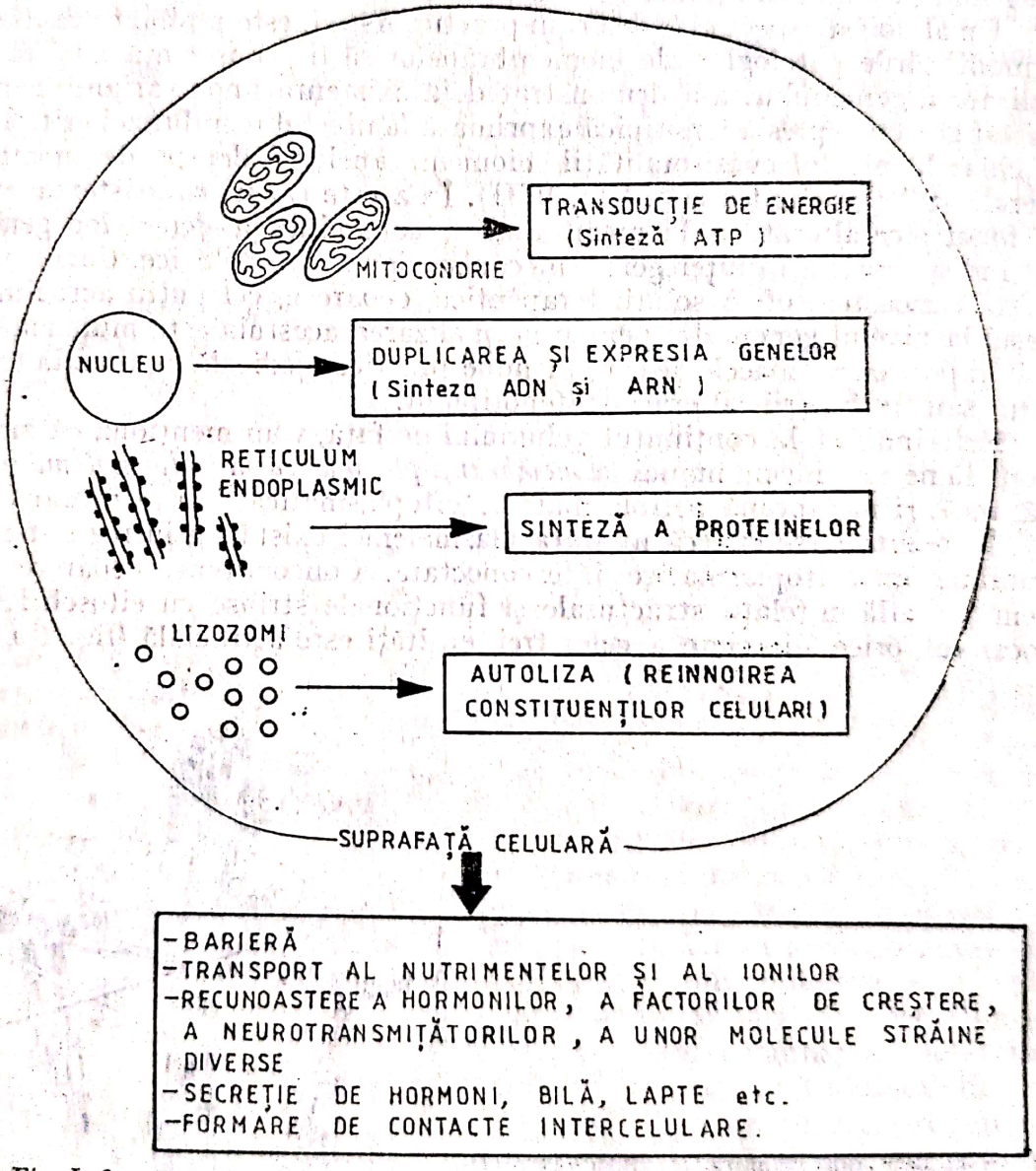


Fig. I. 2 — Rolurile majore ale structurilor celulare de bază (După C. A. Pasternak, Interdiscipl. Sci. Rev., 1985, 10, p. 42).

Scanned with OKEN Scanner

De aceea, ne-am referit cel mai frecvent la ansamblul entităților menționate; de altfel în ultimii ani se exprimă tendința reunirii acestora într-un concept comun, sub denumirea generică de suprafață celulară. Mai mult, relațiile de ordin funcțional și structural ale plasmalemei se extind chiar la nivelul matricei extracelulare și al lamelor bazale.

În figura 2 sînt prezentate sintetic funcțiile componentelor de bază ale celulei, comparativ cu cele ale suprafeței celulare. Multitudinea și importanța acestor funcții pentru viața celulei reprezintă motivele concrete ale dezvoltării actuale a membranologiei. Într-o serie de capitole ale lucrării am încercat să prezentăm pe baza datelor recente sau mai vechi, dar definitiv atestate, o imagine succintă asupra compoziției, organizării structurale și a funcțiilor suprafeței celulare. Am optat pentru o prezentare relativ extinsă a citoscheletului datorită datelor noi referitoare la această structură, acumulate în ultimii ani, achiziții care au întregit evident imaginea asupra unor procese de la nivelul biomembranelor.

O dificultate majoră a decurs din necesitatea efectuării unei selecții a rezultatelor referitoare la implicarea suprafeței celulare în diferite procese patologice. După cum se observă din figura 3, plasmalema și structurile

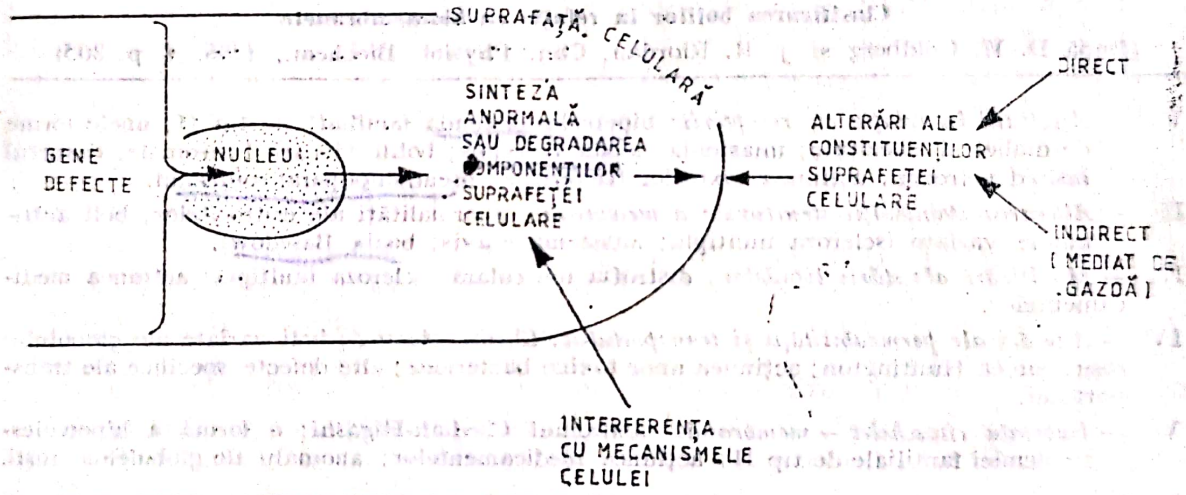


Fig. I. 3 — Mecanisme generale de alterare a suprafeței celulare și integrarea acestora în patologie (După G. E. Griffith și C. A. Pasternak, Clinical Sci., 1982, 63, p. 1).

asociate acesteia pot fi ținta unor alterări de origine multiplă. Astfel, sînt bine conturate următoarele grupe de mecanisme: 1) *prin defecte genetice* ce conduc la sinteza anormală sau la degradarea componentelor suprafeței celulare; acest mecanism intervine în: anemiile hemolitice ereditare, trombocitopatiile ereditare, distrofiile musculare, bolile cu afectare a stocării lizozomale, hipercolesterolemia familială, aminoacidurii, afecțiuni demielinizante etc.; 2) consecutiv *interferenței mecanismelor celulare*, care o dată perturbate vor conduce la alterări ale membranei, în diferite tipuri de neoplazii, infecții virale, anumite boli produse de bacterii și protozoare, psoriazis, ca și într-o serie de maladii rezultate din interacțiunea factori genetici-mediu (obiectul ecogeneticii); 3) *alterări directe ale membranei* prin acțiunea unor toxine animale, toxine bacteriene (holeră, tetanos, difterie, botulism etc.);

Scanned with OKEN Scanner

4) *alterări indirecte* mediate de organismul gazdă, afectat de o anumită boală, intervenind în numeroase afecțiuni, dintre care enumerăm: boala Basedow, miastenia gravis, artrita reumatoidă, diabetul juvenil, anemia pernicioasă, hepatitele cronice, scleroza multiplă, dislipoproteinemiile etc.

Obligativitatea selecției de date referitoare deopotrivă la suprafața celulară normală și patologică ne-a impus respectarea unor criterii. Cel mai important a constat în prezentarea unor aspecte de interes cît mai larg, preferînd însă în locul unei extensii superficiale, pe cît posibil aprofundarea acestora, ceea ce, evident, a însemnat renunțarea completă la tratarea altora. Capitolul distinct, referitor la membrana eritrocitară, se justifică prin faptul că aceasta este incomparabil mai bine cunoscută decît plasmalemele altor tipuri celulare. De aceea, a fost posibilă o imagine de ansamblu mai convingătoare asupra relației biomembrane-patologie.

După cum se știe, în medicină, poate mai mult decît în cazul altor științe, abundă clasificările. Bolile cu determinism la nivelul suprafeței celulare sînt, deocamdată, mai dificil de reunit într-o clasificare coerentă. În tabelul I este schițată o asemenea clasificare.

TABEL 1

Clasificarea bolilor în relație cu biomembranele

(După D. M. Goldberg și J. R. Riordan, Clin. Physiol. Biochem., 1986, 4, p. 305)

I	— *Afecțiuni în relație cu receptorii:* hipercolesterolemia familială de tip II; unele forme de diabet și obezitate; miastenia; boala Basedow; bolile stocării lizozomale; diabetul insipid nefrogen; acțiunea toxinelor bacteriene; pseudohipoparatiroidismul.
II	— *Alterarea stabilității structurale a membranei:* anormalități ale eritrocitelor; boli autoimune variate (scleroza multiplă; miastenia gravis; boala Basedow).
III	— *Modificări ale stării lipidelor*: distrofia musculară; scleroza multiplă; acțiunea medicamentelor.
IV	— *Alterări ale permeabilității și transportului:* fibroza chistică; boli variate ale globulului roșu; coreea Huntington; acțiunea unor toxine bacteriene; alte defecte specifice ale transportului.
V	— *Interfața citoschelet — membrană:* sindromul Chediak-Higashi; o formă a hipercolesterolemiei familiale de tip II; acțiunea medicamentelor; anomalii ale globulelor roșii.

Observație: clasificarea nu este completă; de notat că la producerea unei anumite boli concură mai multe mecanisme.

Suprafața celulară normală și patologică se află încă departe de cunoașterea aprofundată, necunoscutele multiplicîndu-se odată cu pătrunderea la nivelul cel mai subtil al organizării sale, molecular și submolecular. De aceea, în paginile cărții se află și ipoteze sau date controversate. O problemă dificilă a fost și selecția referințelor bibliografice. În prezent devine imposibil să se menționeze toți cercetătorii, prestigioși sau anonimi, care au elaborat pas cu pas edificiul cunoașterii biomembranelor și al structurilor asociate. De aceea, bibliografiile selective de la finele capitolelor trebuie acceptate ca puncte de reper în recursul la surse mai detaliate. Nu am utilizat decît o parte din fondul documentar de care dispunem.

Indicele de termeni va permite o mai bună utilizare a informației și va corecta într-o măsură disparitățile de sistematizare.

Scanned with OKEN Scanner

Nici o carte nu se poate scrie fără gîndul la cititorii săi potențiali. Noi ne-am propus să ne adresăm medicilor practicieni și studenților în medicină. Pentru colegii cu un domeniu comparabil de preocupări cu al nostru îl vom cita pe Blaise Pascal: *„Cărțile cele mai bune sînt acelea, pe care cei care le citesc cred că le-ar fi putut face"* (citat din „De l'Esprit géométrique").

* * *

Mulțumim tuturor celor ce ne-au ajutat pe toată durata scrierii acestei cărți. În mod particular, exprimăm recunoștința noastră Prof. Dr. Doc. V. Vasilescu care a reușit să creeze și să mențină o continuitate ce ne-a stimulat, a manifestărilor științifice din domeniul biofizicii, în cadrul cărora biomembranele au reprezentat un subiect principal.

Mulțumirile noastre tovarășelor Gerlinde Corfu, care a realizat în mare parte iconografia volumului, Emilia Jâjâie și Dumitrița Grom, pentru dactilografierea și rezolvarea unor servituți ale redactării.

În încheiere, ținem să mulțumim, în mod deosebit, conducerii Editurii Medicale pentru interesul pe care l-a exprimat în apariția acestei cărți.

II. Scurt istoric al evoluției cunoașterii biomembranelor

„Este extrem de evident că odată cu extinderea relației biologiei moleculare a biomembranelor cu alte arii ale biomedicinii, explorarea membranelor plasmatice atrage nu numai un mare număr de biochimiști și biofizicieni, dar stîrnește un interes deosebit și în științele clinice".

D. F. H. WALLACH (1972)

În evoluția materiei vii, membrana celulară reprezintă primul organit celular diferențiat, de aceea ea s-a perfecționat și diversificat mult în decursul acestui îndelung proces. Cea mai veche funcție a biomembranelor constă în delimitarea teritoriilor intracelulare de mediul fizic exterior, constituind astfel un obstacol împotriva egalizării termodinamice exercitate de mediu. Fără biomembrane viața nu este posibilă, deoarece prin intermediul lor celulele își asigură o compoziție strict specifică, schimbînd totodată cu mediul substanțe dintre cele mai diverse, energie metabolică și informație biologică. Din acest punct de vedere, remarcăm observația lui Lewis Thomas care afirmă că însuși pămîntul și-a constituit propria sa membrană, „cea mai mare membrană din lume", care să se opună tendinței de echilibru energetic din natură și, concomitent, să protejeze viața de acțiunea unor factori nocivi propagați din mediul extraterestru. Viața pe pămînt este protejată contra pătrunderii excesive a radiațiilor ultraviolete printr-o autentică „membrană" de ozon, situată la 50 kilometri de sol (32). Este motivul pentru care pămîntul seamănă de la distanță cu o uriașă celulă vie, pulsatilă, de culoare albastră, imagine ce i-a impresionat pe cosmonauți.

Pînă în jurul anului 1950 biomembranele erau considerate, aproape exclusiv, simple bariere de permeabilitate, în mare măsură și pentru faptul că o serie de metode, biochimice și biofizice, nu erau încă adaptate cercetării acestei structuri. Pe de altă parte, obiectivele cercetării din domeniul biologiei moleculare se concentrau către cunoașterea principalelor macromolecule biologice și în mod deosebit, a acizilor nucleici. În ultimele două decenii, însă, studiul biomembranelor a concentrat interesul unui important număr de echipe de cercetare, inclusiv din domeniul cercetării legată direct de clinică, pentru ca în ultimii ani fluxul de informație din acest domeniu să se transforme într-o avalanșă imposibil de dominat. Astfel, dacă în 1968 au fost publicate 800 de lucrări în domeniul „membranologiei" (denumirea propusă pentru cercetarea biomembranelor), în 1970 apăreau 3000 de lucrări, pentru ca în 1979 să se ajungă la 6000 lucrări, în timp ce 20 de ani, între 1948 și 1968 erau publicate sub 3000 de lucrări (28). După cum se observă din figura 1, începînd cu anul 1968 creșterea numărului de lucrări referitoare la membranele celulare

Scanned with OKEN Scanner

a luat o amenințătoare alură exponențială. Acest fenomen s-a concretizat în multiple rezultate.

Concomitent cu noile descoperiri au crescut proporțional și întrebările, necunoscutele, la care trebuie să răspundă cercetarea fundamentală și cea clinică.

Pînă la obținerea imaginii actuale a biomembranelor au fost parcurse mai multe etape, pe care le prezentăm succint în continuare, retrospectivă utilă deoarece unele din datele vechi au reușit să reziste presiunii timpului.

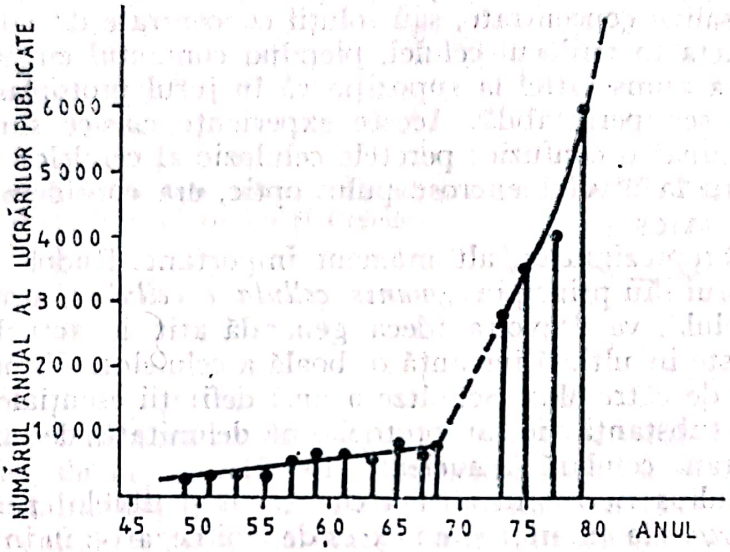


Fig. II. 1 — Estimarea numărului anual de lucrări publicate în domeniul cercetării biomembranelor (După A. Rothstein, 1980) (28).

În 1665, la vîrsta de 29 ani, Robert Hooke publică „Micrographia", carte în care utilizează pentru prima oară concomitent cu denumirea „pori microscopici", termenul celulă (*cellula*) în sensul său biologic referindu-se la structura microscopică a plutei. El era un adversar declarat al lui Newton, căruia de altfel îi va furniza prin lucrările sale date utile în formularea legii gravitației universale și a studiului dispersiei luminii. Abia în 1824, R. J. H. Dutrochet prezintă însă primele observații care, indirect, pot fi considerate drept atestarea existenței unei frontiere celulare, demonstrînd că menținerea laolaltă a celulelor globulare se efectuează prin forțe adezive. Alt eveniment important se produce în 1831, cînd Robert Brown observă, în interiorul celulelor vegetale, nucleul, pentru ca în 1838—1839 colaborarea dintre Mathias Schleiden și Theodor Schwann (dar îndeosebi prin contribuția ultimului) să conducă la elaborarea teoriei celulare, cea mai importantă generalizare din istoria biologiei. În anul următor (1839) T. Schwann va publica istorica sa aserțiune: „partea elementară a țesuturilor sînt celulele, similare în general dar diverse ca formă și funcție. Esențialul vieții constă în formarea celulelor". Universalitatea celulei drept component al structurilor vii, unitate fundamentală a acestor structuri a propulsat enorm cercetarea biologică și medicală a timpului. Astfel încît, curînd Karl W. Nägeli (1855), observînd diferențe în penetrarea pigmenților la celulele vegetale normale în comparație cu cele alterate, exa-

Scanned with OKEN Scanner

minează periferia celulei pe care o denumește *membrană plasmatică*. Termenul de membrană a fost derivat din latinul *membrana*, cu sensul de înveliș, coajă, dar și pergament. K. W. Nägeli este deopotrivă și un precursor al geneticii, descoperind în nucleu niște formațiuni denumite bastonașe, cromozomii de mai tîrziu (denumiți astfel în 1888 de către H. Sorby de Sheffield), cărora cercetarea timpului nu era pregătită să le descifreze importanța, deși Gregor Mendel își începuse meticuloasele studii. Tot K. W. Nägeli va pune în evidență împreună cu K. Cramer (1855), surprinzătoare modificări ale celulelor vegetale, denumite plasmoliză și deplasmoliză. Peste puțin timp, Hugo de Vries va relua experimentul, constatînd apariția plasmolizei la celulele vegetale introduse în soluții saline concentrate, sau soluții concentrate de zaharoză. Protoplasma se retracta în mijlocul celulei, pierzînd contactul cu peretele celular din celuloză. S-a ajuns astfel la supoziția că în jurul protoplasmei se află o membrană fină semipermeabilă. Aceste experiențe clasice sînt importante, deoarece au eliminat o confuzie: peretele celulozic al celulelor vegetale, vizibil fără probleme la nivelul microscopului optic, era considerat drept membrană celulară.

Anul 1858 reprezintă un alt moment important: Rudolf Virchow, pornind de la celebrul său principiu *„omnis cellula e cellula"*, orice celulă provine din altă celulă, va dezvolta ideea generală atît de actuală în prezent, că orice boală este în ultimă instanță o boală a celulelor. Urmează, în 1861 elaborarea clară de către Max Schultze a unei definiții esențiale: „celula este o acumulare de substanță vie sau protoplasmă delimitată definit în spațiu și posedînd membrană celulară și nucleu" (19, 21).

În 1868 Julius Bernstein afirmă că nervul și fibrele nervoase posedă ioni pozitivi în exces la exterior și un exces de ioni negativi în interior.

Anul 1890 poate fi considerat un moment deosebit în istoria cunoașterii biomembranelor, deoarece Wilhelm Pfeffer — botanist german, definește, pornind de la experimente, extrem de clar și de concis conceptul de biomembrană: 1) celula este înconjurată de membrana celulară; 2) membrana este o barieră universală în afara trecerii apei și a solviților. Enunțul lui W. Pfeffer de o maximă simplitate rămîne un model pentru unele concepte mult prea sofisticate de azi. Stabilirea faptului că membrana plasmatică reprezintă o barieră majoră de permeabilitate a stimulat o serie de studii referitoare la pătrunderea substanțelor în celule. Una dintre experiențele cele mai sugestive pentru demonstrarea proprietăților de permeabilitate ale suprafeței celulei a fost efectuată de către Hugo de Vries (1885). Prin microchirurgie el a eliminat membrana și citoplasma celulelor vegetale, neconservînd decît o vacuolă cu membrana intactă. Acest sistem își conserva proprietățile osmotice, comportîndu-se ca un osmometru, umflîndu-se sau contractîndu-se funcție de concentrația soluțiilor de zaharoză în care era plasat. După celulele vegetale, primele celule animale utilizate în experimente devin globulele roșii, pionieri în acest domeniu fiind Grijn și Hedin (1896—1897).

La sfîrșitul secolului al XIX-lea se conturau deja cîteva idei precise asupra naturii și structurii biomembranelor: structuri foarte fine (sub 0,2μ m, minimum rezolutiv al microscopului optic) și paucimoleculare, deci, constituite dîn cîteva straturi de molecule.

Primul progres cert a fost posibil prin lucrările lui Charles Overton, din Zurich (1895—1900). El a obținut, pe celule animale și vegetale, cîteva rezultate foarte clare: substanțele lipofile (hidrocarburi, solvenți organici,

Scanned with OKEN Scanner

eteri, alcooli) pătrund mult mai rapid în celule decât substanțele polare, hidrofile. C. Overton a precizat, de asemenea, că acțiunea rapidă a anestezicelor asupra celulelor nervoase este consecința penetrării lor în țesuturi, determinată de proprietățile lipofile, de solvenți ai grăsimilor. Aceste rezultate i-au sugerat natura lipidică a biomembranei, sau în expresia sa „lipoidală", deoarece el denumea grăsimile „lipoizi". C. Overton a furnizat date valabile și în prezent, explicînd permeabilitatea mare a membranelor pentru substanțele lipofile prin marea miscibilitate a acestora cu lipidele membranare. Astfel a fost elaborat, deși încă incert, întîiul model al unei biomembrane (fig. 2 a).

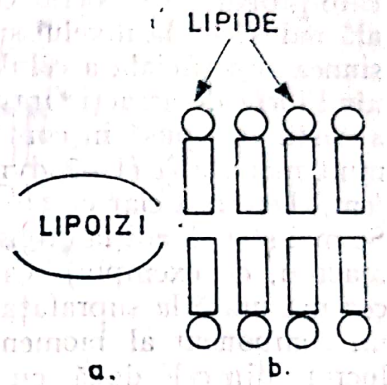


Fig. II. 2 — Primele două modele istorice ale membranei celulare: : a) Overton; b) Gorter și Grendel.

Primul model membranar conturat clar a fost elaborat de către E. Gorter și F. Grendel, de la Universitatea din Leida, care au extras lipidele din globulele roșii, etalîndu-le apoi în balanța inventată în 1917 de Irving Langmuir, astfel devenind posibilă măsurarea ariei unui strat monolipidic. După etalarea lipidelor în monostrat, în cuvele Langmuir ei au constatat că suprafața obținută reprezenta dublul suprafeței totale a eritrocitelor utilizate, de unde concluzia că lipidele se dispun în membrană sub formă de strat dublu. Conceptul de strat bimolecular de fosfolipide de la nivelul membranei rezistă pînă azi (fig. 2 b). Reprezentarea membranei de către Gortel și Grendel constituie primul model lamelar dintr-o întreagă serie de modele concepute în perioada 1925—1950.

Peste cîțiva ani, în 1933, doi cercetători finlandezi, P. Collander și H. Barlund măsoară permeabilitatea celulelor algei *Chara ceratophylla* pentru diferiți neelectroliți în corelație cu coeficientul de partiție al acestor substanțe (7). Ei constată că solubilitatea ulei/apă a substanțelor este direct proporțională cu gradul de permeabilitate al membranei pentru aceste substanțe. Un fapt extrem de important este exprimarea cantitativă a acestei permeabilități în mol/cm²/oră/mol/litru. Aceasta le-a permis să observe că moleculele mici pătrund în celulă mai rapid decît le-ar permite-o solubilitatea în ulei, ceea ce l-a condus pe P. Collander la o concluzie fundamentală: „moleculele de dimensiuni medii și mari penetrează membrana plasmatică doar cînd sînt dizolvate în lipide, cele mai mici pot pătrunde și pe o altă cale. Astfel membrana plasmatică pare a acționa deopotrivă ca un solvent selectiv și o sită moleculară" (7). În consecință, imaginea membranei devine mai complexă, un mozaic conținînd zone lipidice și pori apoși.

În curînd (1934) vor începe lucrările în domeniul studiului biomembranelor James Danielli, de la Princeton University și Hugh Davson, de la University College of London. Primul se va bucura de o longevitate deosebită, de

Scanned with OKEN Scanner

unde ocazia scrierii unor retrospective extrem de utile în reconstituirea evoluției conceptelor referitoare la structura membranelor celulare (9, 10, 11).

Primele lucrări efectuate de J. Danielli constau în realizarea unei cuantificări mai pronunțate a datelor obținute de P. Collander, extinzînd experimentele de măsurare a permeabilității și la bacteria *Beggiaitoa mirabilis*. El ajunge la concluzia că traversarea membranei depinde în primul rînd de diametrul moleculei și evaluează chiar dimensiunea medie a unui por, comparabilă cu diametrul unei molecule de sucroză (aproximativ 8,8 Å). Ulterior, J. Danielli începe fructuoasa colaborare cu H. Davson și împreună vor lua în considerare experiențe efectuate de Cole (1932), Harvey și Shapiro (1934), care probau că modelul Gorter-Grendel nu poate explica tensiunea superficială redusă de la nivelul suprafeței celulare. Astfel a fost măsurată direct tensiunea superficială a celulelor cu un tensiometru Lecomte du Noüy, determinînd forța de atracție între suprafața celulei și un mic inel de platină cu care aceasta este pusă în contact. În mod surprinzător tensiunea superficială era mult mai slabă (1—2 dyne/cm) decît cea a straturilor de ulei (7—15 dyne/cm). Devenea clar că biomembranele nu puteau fi alcătuite numai din lipide. Se mai știa că adiția de proteine la ulei (albuș de ou adăugat la ulei extras din macrou, de exemplu) scade tensiunea superficială la valori comparabile cu cea măsurată la suprafața celulelor. Se contura, deci, ideea că proteinele sînt un component al biomembranelor. În 1934, J. F. Danielli semnează prima lucrare din cele două, cu adevărat istorice, împreună cu Newton Harvey, în care se sugerează că dacă proteinele ar fi adsorbite la nivelul stratului lipidic tensiunea stratului de suprafață a lipidelor s-ar reduce. A doua lucrare, semnată împreună cu H. Davson conține și mai clar ideea formulată anterior: dacă proteinele sînt adsorbite pe lipidele membranare, tensiunea superficială redusă de la suprafața celulelor poate fi explicată. Astfel a fost conceput primul model paucimolecular (*paucus*, plural *pauci*, semnificînd în latină puțin, puțin numeros) denumit modelul Danielli-Davson (fig. 3).

În această primă variantă se consideră că membrana este alcătuită dintr-un strat subțire de lipide (lipoizi), probabil, dar nu necesar, dispuse în dublu strat, pe care au fost adsorbite pelicule de proteine presupuse globulare (fig. 3 a). Este interesant de observat că în primul model paucimolecular a fost complet ignorată bariera bilipidică, demonstrată de Gorter și Grendel. Retrospectiv, J. F. Danielli recunoaște această uitare, afirmînd că nu a acordat atenție modelului anterior. În varianta următoare (fig. 3 b) se corectează acest defect, considerîndu-se că există în imediata apropiere a dublului strat lipidic o peliculă de proteine desfășurate, iar la suprafață un strat de proteine globulare. Este drept, că în 1938 nu se știa nimic despre structurile conformaționale ale proteinelor, difracția cu raze X abia începea să fie utilizată. După mai multe încercări, în anul 1943, J. F. Danielli și H. Davson concep modelul ce va deveni celebru, de aceea el merită o descriere detaliată (fig. 3 c). În zona centrală a membranei se află dublul strat de fosfolipide introdus de Gorter și Grendel. Moleculele lipidice sînt contrapuse prin resturile lor de acizi grași, legătura lor fiind asigurată de forțe de atracție slab polare, hidrofobe, în principal de tip Van der Waals. Deoarece se formează un mare număr de legături între resturile metilen ale lanțurilor lungi de acizi grași, ansamblul biomolecular format este coerent. Această foiță lipidică centrală este cuprinsă „în sandvici" între două straturi de proteine cu configurație fibrilară. Lanțurile polipeptidice conțin numeroase resturi de aminoacizi avînd o funcție secun-

Scanned with OKEN Scanner

dară ionizată (resturi de acizi glutamic, aspartic, sau de lizină) și ca urmare la suprafața proteinelor există numeroase sarcini electrice pozitive sau negative. Aceste sarcini sînt neutralizate prin sarcini electrice de semn opuse ale capetelor polare de fosfolipide. În acest mod se stabilesc legături electrostatice care unesc lipidele și proteinele. Membrana devine un complex molecular, cu o zonă centrală hidrofobă de circa 40 Å grosime, intercalată între cele două zone periferice, hidrofile, unde se află proteinele și capetele polare ale fosfolipidelor.

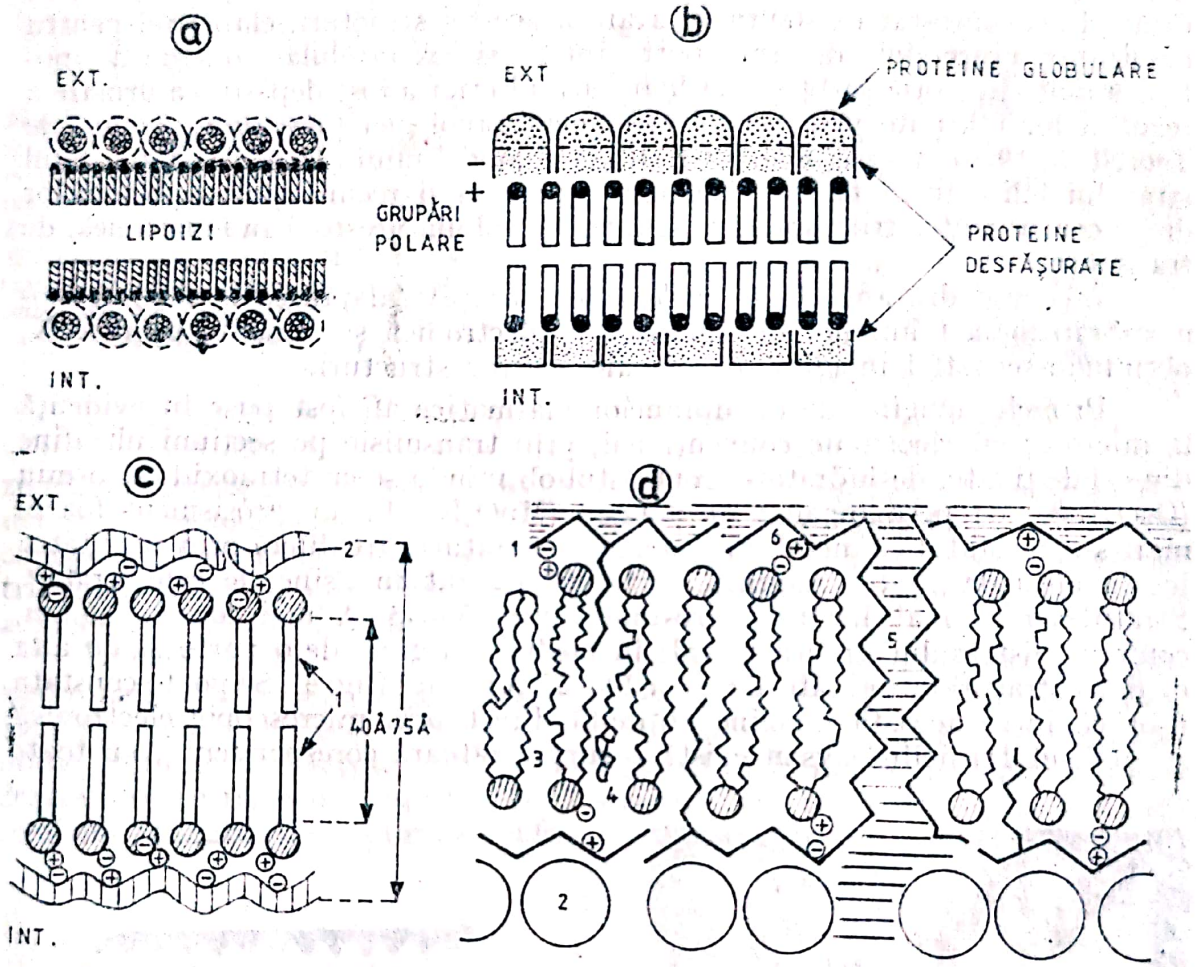


Fig. II. 3 — Evoluția modelului de membrană Danielli-Davson; a) primul model paucimolecular (1934); b) modelul secund paucimolecular (1938); c) versiunea modelului Danielli-Davson din 1943; d) modificări aduse de Danielli modelului original, pentru asimilarea unor descoperiri ulterioare (1956). Explicații în text. (Figurile a și b, după J. F. Danielli, 1982, iar c și d, după P. Mazliak, 1971) (9, 23).

Ansamblul are, în medie, 75 Å grosime și este coerent, datorită caracterului amfipolar al moleculelor de fosfolipide care asigură tranzițiile între zonele de polaritate diferită (4, 9, 10, 23). În 1956, J. F. Danielli aduce cîteva modificări modelului original, în scopul asimilării unor noi descoperiri (fig. 3 d): alături de proteinele fibrilare (notate cu 1 în figura 3 d) se adaugă proteine globulare (2, în aceeași figură) în acord cu asimetria membranelor și existența unor enzime la nivelul acestora; fosfolipidele (3) conțin lanțuri de acizi grași cu structură ce nu mai este rigidă, ci dezordonată; la nivelul stratului bimolecular lipidic se pot glisa steroli, sau alte lipide neutre (4); se adaugă pori aposi (5) căptușiți

de proteine și traversînd grosimea stratului bilipidic; persistă legătura, electrostatică de tip polar între lipide și proteine (6), existînd și legături de tip hidrofob între aceleași molecule (7).

Conceput prin utilizarea unor date cu totul indirecte, într-o perioadă cînd vizualizarea membranei nu era posibilă, chiar analiza în amănunt a componentelor moleculare fiind la începuturile sale, modelul Danielli-Davson a rezistat aproape 3 decenii. De altfel, tocmai din cauza faptului că existența biomembranelor nu era certificată prin probe directe, prin imagini, unii cercetători au contestat existența ca atare a acestei structuri, elaborînd pentru explicarea proceselor de transport intra- și extracelular o serie de ipoteze reunite în teoria sorbțiunii. Chiar dacă ulterior a fost depășit, ca urmare a rezultatelor obținute prin dezvoltarea membranologiei (denumire propusă de Teorell, în 1966), o serie de idei conținute în model rămîn valabile și azi: rolul stratului bilipidic ca barieră izolatoare, precum și recunoașterea proteinelor drept componente structurale, ca și intuirea rolului acestora în fenomenele de transport.

Începînd din anul 1950 se dezvoltă intensiv adaptarea la studiul biomembranelor a tehnicilor de microscopie electronică și difracție cu raze X, obținîndu-se astfel imagini directe ale acestor structuri.

Primele imagini ale membranelor plasmatice au fost puse în evidență la microscopul electronic convențional, prin transmisie pe secțiuni ultrafine din celule fixate, deshidratate, contrastul obținîndu-se cu tetraoxid de osmiu (OsO_4) sau cu permanganat de potasiu (MnO_4K). La un grosisment foarte mare s-a constatat că membrana prezintă 3 straturi care diferă prin opacitatea lor la electroni, este imaginea denumită figurat în „șine de cale ferată". Stratul central, mai clar, are o grosime de circa 30—35 Å (mai corect, 3,5 nm, conform Sistemului Internațional), în medie, mărginit de o parte și de alta de două straturi întunecate, de circa 20—25 Å fiecare (fig. 4). Se poate constata ușor că între această imagine obținută direct prin microscopie electronică și modelul Danielli-Davson există o surprinzătoare corespondență, cu toate

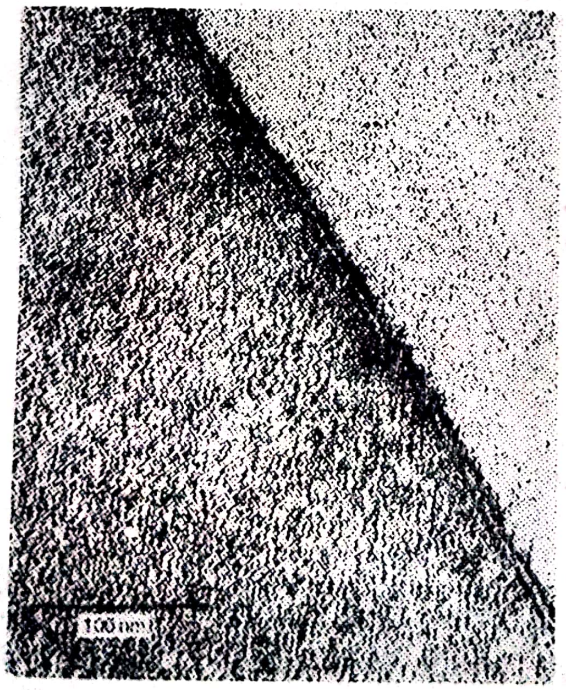


Fig. II. 4 — O imagine istorică: prima observație directă a membranei plasmatice la microscopul electronic prin transmisie. Eritrocitul a fost secționat, după fixare cu permanganat. Frontiera trilamelară corespunzînd plasmalemei se observă foarte clar (Micrografie electronică originală efectuată de J. D. Robertson, 1964 și preluată de R. Harrison și G. G. Lunt, 1980) (19).

Scanned with OKEN Scanner

că modelul a fost conceput numai pe baza unor probe indirecte. Straturile negre de pe micrografii corespund zonelor opace pentru electroni din membranele examinate la microscop, iar stratul clar, zonei mai transparente la electroni. Opacitatea rezultă din depunerea metalelor grele conținute în fixatori pe structurile membranare. La nivelul membranelor, aceste metale se depun în zonele polare, unde se stabilesc legături electrostatice între atomii metalici și sarcinile proteinelor sau fosfolipidelor. În fig. 5 se indică

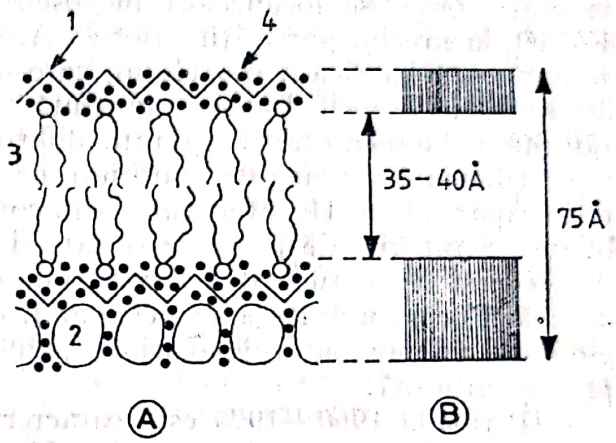


Fig. II. 5 — Corespondența posibilă între modelul Danielli (A) și prima imagine a biomembranelor obținută prin microscopie electronică (B): 1) proteine fibrilare; 2) proteine globulare; 3) fosfolipide; 4) atom metalic (Os sau Mn) fixat după tratare pe părțile polare ale moleculelor, prin atracție electrostatică (după P. Mazliak, 1971) (23).

zonele de depunere metalică în membrană, utilizînd modelul Danielli. Există depunere metalică de o parte și de alta a stratului central hidrofob, care corespunde lanțurilor de acizi grași și acest fenomen se traduce prin imaginea trilaminară. De aceea, la un moment dat s-a crezut în consacrarea definitivă a modelului Danielli-Davson.

În curînd a început o adevărată campanie de vizualizare în microscopia electronică a celor mai diverse membrane celulare, încît P. F. Elbers în anul 1964 sintetiza toate probele morfologice obținute pe cîteva sute de biomembrane obținute din țesuturi diferite, constatînd că în marea majoritate a micrografiilor se regăsea imaginea în 3 straturi (sau tripartită) a membranei celulare. Deosebit de importantă a fost constatarea, prin microscopie electro-

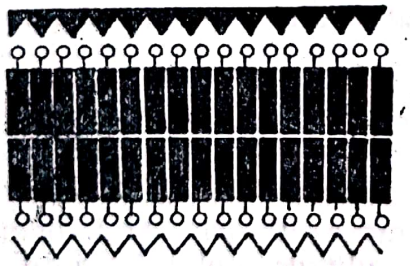


Fig. II. 6 — Diagrama schematică a modelului „membranei unitare" (După J. D. Robertson, 1972) (26).

nică, a prezenței membranelor și la nivelul unor formațiuni din compartimentul citoplasmatic, care se prezentau, de asemenea, sub forma unor imagini trilamelare. Existau variații doar în ceea ce privește grosimea membranei, între 7,5 și 15 nm în ansamblu, dar stratul central clar avea o grosime medie constantă de 2,5—3,5 nm (15). Surprinzătoarea asemănare pînă la identitate a imaginii diferitelor biomembrane l-a condus pe J. D. Robertson (26) să propună modelul „membranei unitare". Termenul utilizat de autor, în ori-

Scanned with OKEN Scanner

ginal, este de *„unit membrane"* și se poate traduce prin „membrană de bază" sau „unitate membranară". Conform acestui model „unitatea membranară" constituie motivul arhitectural constant utilizat pentru construcția tuturor tipurilor de biomembrane. Dar cea mai importantă idee a lui Robertson, ce s-a dovedit foarte productivă ulterior, constă în considerarea membranelor drept structuri asimetrice. Asimetria biomembranelor i-a fost sugerată de reactivitatea diferită a celor două fețe ale biomembranei cu agenții fixatori utilizați: OsO_4 se localizează îndeosebi pe fața internă a membranei, iar $KMnO_4$ la nivelul jumătății externe. Acest fenomen este conținut și în reprezentarea schematică a modelului, care, deși este în mare măsură o preluare a variantei Danielli-Davson, prezintă straturile de proteine de o parte și de alta a biomembranei figurate diferit (fig. 6).

Ultima încercare de continuitate a modelelor lamelare prezentate anterior aparține lui Hechter, care ia în considerare rolul apei în structura membranei. Straturile de proteine situate de o parte și de alta a dublului strat de lipide ar fi alcătuite din unități proteice hidrofile între care se află straturi de apă. Forma unităților proteice ar fi de discuri la membrana polarizată și globulară în momentul depolarizării, cînd ar fi posibilă trecerea apei și ionilor prin membrană.

Perioada 1960—1970 este caracterizată prin o reală invazie de tehnici utile în studiul componentelor biochimice și al structurii biomembranelor. De aceea, se obțin foarte multe date care probează că modelele lamelare, cu punctul lor terminus, exprimat în varianta Danielli-Robertson nu exprimă decît parțial structura și funcțiile biomembranelor. n consecință, va urma un deceniu de căutări mai mult sau mai puțin fructuoase, exprimate în primul rînd prin apariția unor modele în care membrana nu mai este considerată ca avînd o structură lamelară determinată de stratul dublu lipidic continuu, ci este alcătuită din subunități micelare lipidice, ori din subunități lipoproteice (fig. 7).

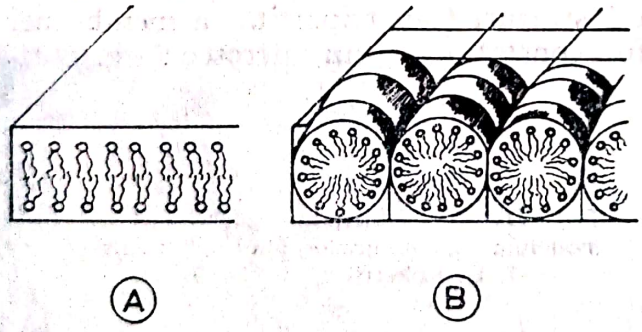


Fig. II. 7 — Dispunerea lipidelor în modelele lamelare" (A) și „modelele micelare" (B) ale biomembranelor.

De fapt, primul model micelar, elaborat de Parpart și Ballentine a apărut înainte de conceperea modelului „membranei unitare", autorii utilizînd o serie de date obținute prin studiul biofizic al dispersiilor de fosfolipide în apă. Ca urmare, încă din anul 1952, Parpart și Ballentine propun un model complet diferit de cele anterioare, în care masele proteice globulare sînt dispersate într-un mediu fosfolipidic. Unele fosfolipide (lecitine și 50% din cefaline) sînt legate electrostatic de proteine, alte lipide se organizează în dispersie stabilă în apa generală de imbibiție. Un astfel de model permitea posibilitatea existenței unor pori apoși membranari, necesari în explicarea difuziunii ionilor iar conformația globulară a proteinelor permitea, într-o

Scanned with OKEN Scanner

măsură, explicarea activităţilor enzimatice ale membranei, care începeau să fie cunoscute. Trecută aproape neobservată la început, în mare măsură ca urmare a audienţei dobîndite de modelul Danielli-Robertson, ideea organizării micelare a membranei va fi frecvent reluată după anii 1960—1965, în primul rînd de către cercetătorii preocupaţi de studiul conversiei energiei la nivelul membranelor mitocondriale şi cloroplastelor.

În continuitate cu primul model micelar se află modelul Lucy şi Glauert (1964), în elaborarea căruia s-a pornit de la observarea dispersiilor de lipide în apă la microscopul electronic, prin tehnici de coloraţie negativă. Prin această tehnică fondul cîmpului explorat este opac pentru electroni, de aceea structurile examinate apar clare, luminoase pe un fond întunecat. Dispersiile de lipide existente în membrană erau observate la microscop sub forma unor imagini clare hexagonale sau elicoidale, care au fost intrepretate drept un argument în favoarea dispunerii amestecurilor de lipide în micele globulare sau sferice. Ca urmare, Lucy şi Glauert au conceput membrana ca fiind alcătuită din micele sferice juxtapuse, cu diametrul de 4 nm, plonjate într-un strat de proteine, sau glicoproteine asupra căruia nu ofereau detalii. Unele micele lipidice puteau fi totuşi înlocuite de proteine globulare de aceeaşi talie, iar între micele se delimitau pori apoşi, cu raza de circa 4 Å (0,4 nm) care explică permeabilitatea pentru apă şi diferiţi metaboliţi solubili. În plus, autorii afirmau existenţa unei flexibilităţi şi deformări constante a ansamblului, prin glisarea subunităţilor unele pe altele (22).

Prin aceste două modele micelare se revenea din nou la probe biofizice indirecte, constînd în esenţă, din studiul comportării suspensiilor de lipide în apă. Între timp însă, tehnicile de microscopie electronică evoluau, devenind de neînlocuit în cercetarea biomembranelor. În cazul primelor imagini obţinute în microcopie electronică, exploatate de J. D. Robertson, substanţele chimice utilizate puteau fi la originea unor artefacte ca urmare a dezorganizării induse de tratamentul cu substanţe chimice, fixate direct pe structura membranară. Noua tehnică de coloraţie negativă reprezenta un progres important, deoarece nu afecta direct membrana. Cel care a utilizat-o productiv a fost Fernandez-Moran (1960). Principala sa descoperire constă în punerea în evidenţă a crestelor mitocondriale pe suprafaţa internă a membranei mitocondriale interne. Descoperirea a fost preluată de D. E. Green şi J. F. Perdue (1966), care au imaginat un nou model de membrană al unităţilor repetitive, complet diferit de cel al lui Danielli (18). Fiecare subunitate este un complex lipo-proteic în care proteinele structurale şi enzimatice, pe de o parte, şi fosfolipidele, pe de altă parte, sînt în esenţă reunite prin legături hidrofobe. Proteinele prezintă o formă globulară, fiind posibile modificări conformaţionale, iar joncţiunile dintre unităţi sînt, de asemenea, rezultatul unor interacţiuni de tip hidrofob. Deşi s-a referit iniţial la mitocondrie, Green a extins ulterior modelul unităţilor repetitive şi la alte tipuri de biomembrane dotate cu proprietăţi de transport activ şi, prin urmare, conţinînd ATP-aze. Ulterior el şi-a modificat opiniile, adoptînd modelul „cristalin" al membranei apropiat de imaginea actuală a biomembranelor (18).

În jurul anilor 1960 se dezvoltă în continuare o serie de tehnici ce vor conduce la progrese decisive în cunoaşterea compoziţiei, structurii şi funcţiilor biomembranelor. O evoluţie deosebită cunoaşte microscopia electronică prin punerea la punct în vederea studiului structurii biomembranelor a tehnicii de criofractură în vid de către H. Moor, K. Mühlethaler şi H. Frey-Wys-

Scanned with OKEN Scanner

sling (1961), finalizare a unor încercări ce datau de aproape două decenii. Prin această metodă, mult prefecționată ulterior, celulele nu suferă nici o prelucrare chimică și, deci, se elimină în mare parte artefactele potențiale de acest gen (24, 25). Criofractura sau criodecapajul reprezintă un procedeu ce a revoluționat conceptele referitoare la organizarea arhitectonică a moleculelor la nivelul membranei. Astfel, pentru prima oară au fost vizualizate, pe imaginea de microscopie electronică, proteinele, constatîndu-se că ele nu formau straturi compacte la nivelul membranei. Devenea cert că unele proteine traversează integral membrana, iar altele sînt situate fie îndeosebi la nivelul feței externe, fie pe fața internă (a se vedea cap. III, VII). S-a obținut astfel una din probele cele mai relevante asupra asimetriei edificiului membranar (a se vedea cap. VII).

Ca o consecință a diversității metodelor s-a conturat o adevărată „strategie și tactică" în cercetarea biomembranelor (38).

Numeroasele date experimentale acumulate, care treceau biomembranele în centrul preocupărilor din domeniul superdisciplinei cunoscută sub numele de biologie moleculară, conturau tot mai clar posibilitatea elaborării unui nou concept asupra organizării acestor structuri. Astfel, începînd din anul 1966 se conturează modelul de membrană denumit al mozaicului lipide-proteine globulare *(Lipid-Globular Protein Membrane Model)*. Anul 1972 reprezintă un moment important în evoluția cunoașterii biomembranelor, deoarece S. J. Singer și G. L. Nicolson publică în revista „Science" un articol în care prezintă, cu o coerență de excepție, argumente în susținerea a ceea ce de atunci înainte se va numi *modelul mozaicului fluid al structurii membranei celulare*, în care dispunerea proteinelor în matricea dublului strat lipidic este comparată cu pozițiile aisbergurilor ce plutesc într-un ocean (29). În curînd acest concept va fi acceptat de către marea majoritate a cercetătorilor. Rareori în istoria cunoașterii structurilor vii un concept a avut o asemenea audiență și, ulterior, o asemenea productivitate. Deși din acest scurt istoric lipsesc multe nume care s-au consacrat în membranologie — fiind însă prezente în bibliografia capitolelor următoare — , ar fi nedrept să nu adăugăm la numele autorilor modelului mozaicului fluid și cel puțin pe cel al lui D. F. H. Wallach (fig. 8), care a fost extrem de aproape de elaborarea unui model asemănător. El este de asemenea primul care a susținut cu persistență relația dintre biomembrane și patologie, materializată și prin două cărți cu această temă (36, 37). În același sens, trebuie menționați J. Lenard, P. H. Zahler și D. Branton (6, 20, 39). Concomitent, nu trebuie uitat că modelul mozaicului fluid își are filiația în conceptele anterioare elaborate de către J. F. Danielli, H. Davson, A. K. Parpart, R. Ballentine, J. D. Robertson, E. Ponder și încă mulți alți cercetători. Datorită importanței sale, modelului mozaicului fluid i-am rezervat o secțiune separată. Ulterior elaborării sale, acest model a fost susținut de numeroase date experimentale. Modelul mozaicului fluid a propulsat înțelegerea bazelor moleculare ale funcțiilor biomembranelor și ale structurilor asociate acestora.

Retrospectiv, constată A. Rothstein (28), perioada 1948—1968 poate fi denumită „vîrsta de aur" a descrierii cinetice și termodinamice a transportului și permeației de la nivelul biomembranelor. De asemenea, în această perioadă s-a demonstrat, îndeosebi prin utilizarea membranelor artificiale, existența dublului strat lipidic ca suport al membranei. „Membranologii" erau la origine îndeosebi fiziologi, biofizicieni sau specialiști în microscopie

Scanned with OKEN Scanner

electronică. După 1970, grupuri noi de cercetători sînt atrași de studiul biomembranelor, care vor deveni, în curînd, cel mai abordat subiect: biochimiști, imunologi, endocrinologi, virologi, oncologi și chiar geneticieni. Cel mai important motiv de atracție consta în posibilitatea examinării cu noile tehnici a proteinelor din membrane și a evaluării rolului lor funcțional, în cadrul unei structuri celulare cheie — membrana celulară.

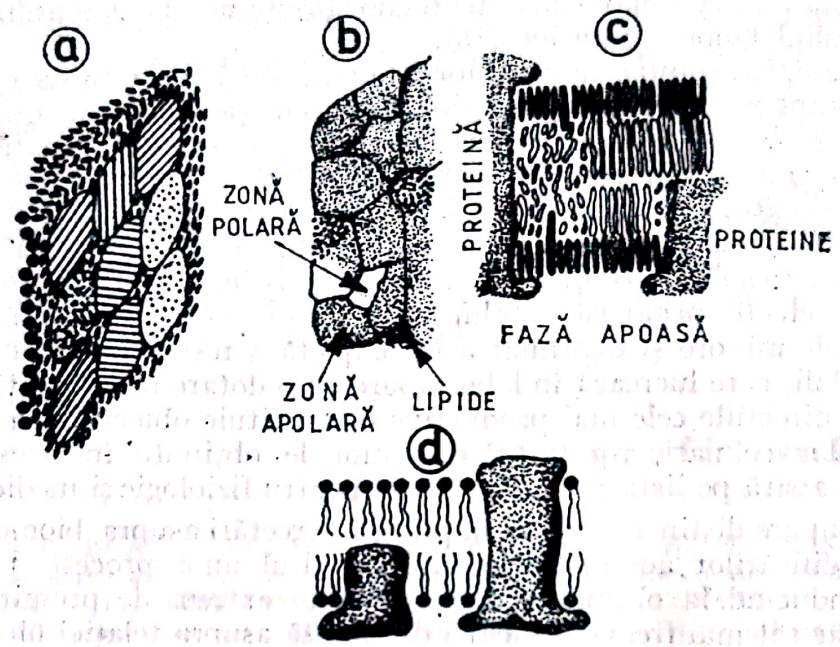


Fig. II. 8 — Alternative ale modelului Wallach-Zahler, prin care se încerca punerea în acord cu datele experimentale a dispunerii proteinelor la nivelul stratului dublu lipidic. Varianta d este foarte aproape de modelul mozaicului fluid (După D. F. H. Wallach, 1972) (37).

Această nouă perioadă, susținută conceptual de modelul inspirat al mozaicului fluid asupra structurii membranei, continuă și în prezent. La baza sa stau, concomitent cu eforturile unui imens număr de cercetători, următoarele tehnici: 1) procedee multiple de marcare, izolare și purificare ale membranelor; 2) utilizarea detergenților pentru „dizolvarea" și extracția proteinelor membranei; 3) dezvoltarea unor probe cu marcheri covalenți, nepenetranți, pentru localizarea componentelor membranei; 4) progresul probelor de marcare specifică a proteinelor funcționale și a locurilor (situsurilor) active ale acestora; 5) utilizarea unor enzime proteolitice în studiul proteinelor legate de membrană; 6) dezvoltarea sistemelor de vezicule subcelulare derivate din membrane specifice; 7) reconstituirea proteinelor funcționale în modelele artificiale de membrane, pînă la realizarea unor „celule artificiale", departe de complexitatea „mașinăriei" celulare, dar reproducînd uneori secvențe importante ale acesteia; 8) dezvoltarea unor agenți cu „*cross linking*" (legare încrucișată) care permit studiul moleculelor vecine unui anumit component; 9) tehnici biofizice sofisticate, dar determinante în obținerea de informații asupra dinamicii moleculare și inframoleculare a biomembranelor: rezonanța electronică de spin, rezonanța magnetică nucleară, microcalori-

Scanned with OKEN Scanner

metria, spectroscopia în infraroșu, dicroismul circular, analiza prin probe de fluorescență, microanaliza nucleară etc.; 10) diversele metode de electroforeză și îndeosebi electroforeza în gel de poliacrilamidă pentru separarea și identificarea proteinelor din membrană; 11) diversificarea și perfecționarea metodelor cromatografice; 12) utilizarea lectinelor purificate pentru studiul glicoproteinelor de suprafață; 13) tehnica de criofractură în vid ca metodă de preparare a biomembranelor pentru examinarea în microscopie electronică; 14) adaptarea rapidă a majorității tehnicilor foarte noi, pentru utilizarea adecvată în studiul biomembranelor (28).

În prezent, evoluția cercetărilor în domeniul biomembranelor este deosebit de complexă. Analiza în detaliu a compoziției stratului dublu lipidic, izolarea, identificarea și studiul pînă la nivel de structură primară și conformațională a proteinelor membranare furnizează continuu date noi. Deși membrana eritrocitară rămîne modelul dominant, investigarea s-a extins, cuprinzînd cvasitotalitatea membranelor celulelor eucariote. Din păcate, inegalitatea accesului la tehnici extrem de sofisticate și costisitoare are cel puțin două efecte negative: proliferarea uneori nejustificată a factologiei experimentale minore și exprimarea incompletă a resurselor unor cercetători foarte capabili, care lucrează în laboratoare cu o dotare insuficientă, depășită. Una dintre direcțiile cele mai productive o constituie obiectivarea moleculară a receptorilor celulari, rezultate excepționale obținute în acest domeniu începînd să apară pe lista premiilor Nobel pentru fiziologie și medicină.

Preocupare distinctă încă de la primele cercetări asupra biomembranelor, studiul modificărilor acestor structuri în cadrul unor procese patologice a evoluat conducînd la obținerea unor rezultate extrem de promițătoare. Ca urmare, apar tot mai frecvent lucrări de sinteză asupra relației biomembrane-patologie (2, 3, 4, 5, 8, 31, 33, 34, 40, 41), precum și un număr enorm de articole sau treceri în revistă în periodicele științifice. Prima carte dedicată examinării relației biomembrane-patologie a apărut, probabil, în anul 1936, autori fiind E. Gellhorn și J. Régnier (16). Integrarea în mecanismele patogenetice ale bolilor a multiplelor rezultate obținute prin studiul relației biomembrane-patologie nu se poate efectua decît prin recursul la întregul ansamblu de cunoștințe din domeniul biologiei moleculare a celulei și din domeniul biochimiei. În acest scop, pentru medicul practician sînt utile o serie de monografii recente, de un foarte bun nivel științific și de o claritate deosebită (1, 12, 42).

Cu riscul unor date incomplete, deoarece bibliografia românească în domeniul cercetării biomembranelor nu a constituit subiectul unei analize, vom menționa că la noi în țară prima prezentare mai extinsă asupra biomembranelor a fost efectuată de către D. I. Roșca (27), iar prima monografie dedicată exclusiv biomembranelor reprezintă meritul lui Gh. Benga (4), în același an (1969), V. Vasilescu și D.G. Mărgineanu publicînd un volum conținînd date referitoare la membrana neuronală (35). Mai multe grupuri de cercetători români au obținut rezultate remarcabile în domeniul biomembranologiei. Conferințele internaționale „Apa și ionii în sistemele biologice" desfășurate trianual la București, sub egida UNESCO și cu efortul Prof. V. Vasilescu și al colaboratorilor săi din cadrul Laboratorului de biofizică al Facultății de medicină din București, au devenit, prin înaltul nivel științific, momente de referință în prezentarea celor mai noi date obținute în studiul biomembranelor.

Scanned with OKEN Scanner

În laboratorul de Histologie al Facultății de medicină din București, au fost obținute o serie de rezultate privind circuitul intracelular normal și patologic al calciului, îndeosebi la nivelul mitocondriei, de către Prof. I. Diculescu, în colaborare cu L. M. Popescu. Prof. I. Diculescu este și coordonatorul primelor manuale de biologie celulară în care membranei i-au fost rezervate un loc corespunzător dinamicii cercetării din acest domeniu (13, 14).

Prin înființarea Institutului de Biologie și Patologie Celulară, condus de Prof. N. Simionescu s-a creat un centru dotat material la nivel mondial, cu rezultate deja bine cunoscute și apreciate pe plan internațional.

În 1986 s-a organizat la Cluj-Napoca un curs internațional FEBS cu tema *„Biomembranes and Diseases"*, ca o expresie a eficacității colectivului condus de Dr. Gh. Benga. Mai menționăm activitatea grupului de cercetători în domeniul biomembranelor, din cadrul Facultății de Biologie — București, condus de Dr. D. G. Mărgineanu. În afară de aceste mențiuni, există și alte grupuri de lucru sau cercetători români care au obținut rezultate notabile în domeniul studiului biomembranelor.

Bibliografie selectivă

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. — *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986.
2. ANDREOLI T. E., HOFFMAN J. F., FANESTIL D. D., SCHULTZ S. G. — *Physiology of Membrane Disorders*, Plenum Med. Book Comp., New York and London, ed. a I-a, 1978, ed. a II-a, 1986.
3. BECH F., LLOYD J. B. — *The Cell in Medical Science*, vol. I, II, III, Academic Press, 1974.
4. BENGA GH. — *Biologia moleculară a membranelor cu aplicații medicale*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
5. BOLIS L., HOFFMAN J. F., LEAF A., eds. — *Membranes and Disease*, Raven Press, New York, 1976.
6. BRANTON D. — Amer. Rev. Plant. Physiol., 1969, 20, 209.
7. COLLANDER R., BERLUND H. — Acta Botanica Fennica, 1933, 11, 1.
8. DAEMS W. TH., BURGER E. H., AFZELIUS B. A. — *Cell Biological Aspects of Disease*, Leiden University Press, 1981.
9. DANIELLI J. F. — *Experiment, Hypothesis, and Theory in the Development of Concepts of Cell Membrane Structure 1930—1970*, în *Membranes and Transport*, vol. I (sub red. *A. N. Martonosi)*, Plenum publ. Corpor., 1982, pp. 3—14.
10. DANIELLI J. F. — *The Bilayer Hypothesis of Membrane Structure*, în *Cell Membranes-Biochemistry, Cell Biology &Pathology* (sub red. *G. Weissmann, R. Claiborne)*, HP Publishing Co. Inc., Publishers, New York, 1975, pp. 3—12.
11. DANIELLI J. F., HARVEY E. N. — J. Cell. Comp. Physiol., 1935, 5, 483.
12. DE ROBERTIS E. D. P., DE ROBERTIS E. M. F. jr. — *Biologie cellulaire et moléculaire*, Presse Univ. Laval, Maloine S.A. édit., Paris, 1983.
13. DICULESCU I., ONICESCU D., BENGA GH., POPESCU L. M. — *Biologie celulară*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1983.
14. DICULESCU I., ONICESCU D., MISCHIU L. — *Biologie celulară*, Editura Academiei R. S. R., București, 1971.
15. ELBERS P. F. — Prog. Biophys. Molec. Biol., 1964, 2, 443.
16. GELLHORN E., RÉGNIER J. — *La perméabilité en physiologie et en pathologie générale*, Masson, et Cie, Paris, 1936.
17. GORTER E., GRENDEL F. — J. Exp. Med., 1925, 41, 439.
18. GREEN D. E., PERDUE J. F. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 1295.
19. HARRISON R., LUNT G. L. — *Biological Membranes*, Ed. a 2-a, Blackie, Glasgow and London, 1980, pp. 1—15.

Scanned with OKEN Scanner

20. LENARD L., SINGER S. J. — J. Cell Biol., 1968, 37. p. 117.
21. LEVIN R. J. — *The Living Barrier*, W. Heinemann Medical Books Ltd., London, 1969, pp. 1—21.
22. LUCY J. A. — J. Theor. Biol., 1964, 7, 360.
23. MAZLIAK P. — *Les membranes protoplasmiques*, Doin, Paris, 1971.
24. MOOR H., MÜHLETHALER K. — J. Cell Biol., 1963, 17, 609.
25. MOOR H., MÜHLETHALER K., FREY-WYSSLING A. — J. Biophys. Biochem, Cytol., 1961, 10, 1.
26. ROBERTSON J. D. — Arch. Intern Med., 1972, 129, 202.
27. ROȘCA D. I. — *Probleme de zoofiziologie celulară*, Editura Academiei R. S. R., București, 1969.
28. RÔTHSTEIN A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1980, 358, 96.
29. SINGER S. J., NICOLSON G. L. — Science, 1972, 175, 720.
30. SJOSTRAND F. S. — Protoplasma, 1965, 63, 248.
31. TAO M. — *Membrane Abnormalities and Disease*, vol. I, II, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
32. THOMAS L. — *The Lives of a Cell*, The Viking Press, New York, 1974.
33. TINDALL V. R., DODSON M. E., GOWENLOCK A. H. — *Essential Sciences for Clinicians*, Blackwell Scient. Publ., 1981.
34. TRUMP B. F., ARSTILLA A. U. — *Pathobiology of Cell Membrane*, Academic Press, vol. I, 1975, vol. II, 1980.
35. VASILESCU V., MĂRGINEANU D. G. — *Introducere în neurobiofizică*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1979.
36. WALLACH D. F. H. — *The Plasma Membrane: Dynamic Perspectives, Genetics and Pathology*, Springer-Verlag, 1972.
37. WALLACH D. F. H. — *Plasma Membranes and Disease*, Academic, Press, 1979.
38. WALLACH D. F. H., WINZLER R. J. — *Evolving Strategies and Tactics in Membrane Research*, Springer-Verlag, 1974.
39. WALLACH D. F. H., ZAHLER P. H. — Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1966, 56, 1552.
40. WARDLE E. N. — *Cell Surface Science in Medicine and Pathology*, MTP Press Ltd., Lancaster, England, 1985.
41. WEISSMANN G., CLAIBORNE R., eds. — *Cell Membranes-Biochemistry, Cell Biology & Pathology*, HP Publishing Co., Inc., New York, 1975.
42. Wills E. D. — *Biochemical Basis of Medicine*, Wright Bristol, 1985.

Scanned with OKEN Scanner

III. Compoziția biochimică și organizarea moleculară a biomembranelor

„Deși proprietățile de bază ale membranelor biologice derivă în primul rînd din proteinele componente, este tot mai evident că aceste funcții pot fi influențate intens de compoziția în lipide. Rolul dublului strat lipidic de barieră și matrice pentru proteinele membranei, exprimat în ipoteza mozaicului fluid, a fost considerabil lărgit în acești puțini ultimi ani".

T. E. THOMPSON, C. HUANG (1986)

Toate membranele biologice, deci atît membranele plasmatice ale diferitelor tipuri celulare cît și membranele intracelulare de la nivelul celulelor eucariote, sînt alcătuite din aceleași tipuri fundamentale de molecule. Componentele majore ale biomembranelor sînt lipidele și protidele. Membranele conțin, de asemenea, glucide legate cu lipidele (glicolipide) sau cu proteinele (glicoproteine). Descrieri laborioase ale compoziției biomembranelor lasă impresia că acestea prezintă variații neînsemnate în structura componentelor. În realitate, se dovedește tot mai frecvent că tocmai structura „resturilor" membranei, adesea variabile de la o metodă de studiu la alta, prezintă un interes deosebit (30). Nu există probabil, membrane cu aceeași compoziție biochimică. Acest adevăr se referă nu numai la membranele diferite funcțional din aceeași celulă, sau la membranele izofuncționale provenind de la același organism, ori la membrane omologe provenind de la specii diferite, dar și la preparări diferite ale aceleiași specii membranare (33). Referindu-ne la ultimul aspect, în vederea analizei componentelor unei biomembrane este necesară separarea sa din țesut, din celulă și de alte specii de membrană din omogenat. Metodele de separare obligă la utilizarea unor procedee de ruptură mecanică sau osmotică, spălări, centrifugări diferențiale sau la întrebuințarea altor procedee de fracționare. Aceste procedee amenință adesea stabilitatea unor molecule mai fragile, riscă să solubilizeze anumite componente ale membranei sau, dimpotrivă, să conducă la o contaminare prin molecule care inițial nu aparțineau membranei.

Cu toate dificultățile enumerate sumar, printr-un efort imens, au fost obținute o serie de date certe privind compoziția biomembranelor.

Biomembranele reprezintă 10—20% din masa celulară, iar proporția de lipide și proteine în cazul plasmalemei este aproximativ egală. Conținutul în lipide și protide variază, uneori, în raport cu funcțiile particulare ale unor biomembrane. În general, membranele mai active metabolic conțin mai multe proteine, ca în cazul membranei mitocondriale interne, la nivelul căreia proporția de proteine este de peste 70%. Dimpotrivă, teaca mielinică este alcătuită din lipide în proporție de peste 75%, datorită rolului său izolant. După cum se observă, se pot distinge — deși o asemenea disjuncție are o valoare relativă — trei tipuri de biomembrane funcție de compoziție. Aceste diferențe

Scanned with OKEN Scanner

TABEL I

Compoziția chimică a biomembranelor
(După G. Guidotti, 1986) (27)

Membrana	Proteine (%)	Lipide (%)	Glucide (%)	Fracțiunea masei proteice	Raportul proteine/ lipide
Mielină	1	79	3	0,18	0,23
Membrane plasmatice:					
Celule hepatice de șoarece	46	54	2—4	0,46	0,85
Eritrocite de om	49	43	8	0,49	1,1
Amoebă	54	42	4	0,54	1,3
Celule hepatice de șobolan	58	42	(5—10)*	0,58	1,4
Limfocite	60	40	(5—10)*	0,6	1,5
Celule HeLa	60	40	2,4	0,6	1,5
Bastonașe retiniene (bovine)	51	49	4	0,51	1,0
Membrană mitocondrială externă	52	48	(2—4)*	0,52	1,1
Reticul sarcoplasmic	67	33		0,67	2,0
Membrană nucleară (ficat, pui de găină)	73	21		0,73	3,5
Membrană mitocondrială internă	76	24	(1—2)*	0,76	3,2
Bacterii Gram-pozitive	75	25	(10)	0,75	3,0
Membrană purpurie de Halobacterium	75	25		0,75	3,0

* Valorile în paranteze au fost deduse din analiza conținutului lipidelor și proteinelor.

au stimulat ideea că rolul funcțional aparține exclusiv proteinelor, opinie serios revizuită în ultimii ani. Alături de cele două componente majore, glucidele reprezintă un component minor și variabil, de la 1—2% pînă la 10—15%, această ultimă alternativă fiind totuși mai frecventă. Ele sînt situate în principal pe fața externă a membranei, prin atașare covalentă la moleculele de proteine sau lipide. De asemenea, la nivelul biomembranelor se asociază o cantitate considerabilă de apă (circa 20% din masa totală), precum și ioni de calciu și magneziu.

Tabelul I conține date de ansamblu asupra compoziției globale în proteine, lipide și glucide a mai multor biomembrane izolate din diferite tipuri de celule.

În afara diferențelor de compoziție funcție de celulele din care provin, biomembranele prezintă variații privind proporția și chiar natura moleculelor componente în mai multe situații fiziologice sau patologice, ca: procesele de degradare și reînnoire, creșterea și diferențierea celulară, infecția virală, transformarea malignă, administrarea de hormoni și medicamente, variațiile temperaturii și stării de nutriție, uneori funcție de vîrsta organismului donor, acțiunea unor agenți fizici etc. Studiul acestor variații constituie subiectul unui număr foarte mare de lucrări publicate.

Scanned with OKEN Scanner

1. LIPIDELE MEMBRANARE

Reprezintă primele molecule a căror prezenţă la nivelul membranei a fost pusă în evidenţă cu certitudine.

Lipidele sînt extrase din membrane, ca de altfel şi din celule sau ţesuturi, utilizînd solvenţi organici. Vechea experienţă, din 1925, a lui Gortel şi Grendel prin care se demonstra existenţa lipidelor în membrană sub forma unui strat dublu a fost demonstrată prin difracţia cu raze X ca şi, indirect, prin intermediul microscopiei electronice efectuată după criofractura în vid a membranelor. Dispunerea în strat dublu a lipidelor membranare, ca urmare a proprietăţilor lor amfifile, reprezintă una din constatările fundamentale care a propulsat cunoaşterea biomembranelor.

Precizarea conţinutului biomembranelor în diferite clase de lipide a fost favorizată de faptul că aceste molecule sînt legate intim în membrane în cadrul dublului strat lipidic, reprezentînd o autentică matrice a biomembranei. Riscul variaţiilor de la o extracţie la alta este, de aceea, redus. S-a stabilit astfel că lipidele prezente în membranele celulelor animale sînt de 3 tipuri: fosfolipide, colesterol şi glicolipide, aflate frecvent într-un raport cantitativ de, respectiv, 75:25:5.

TABEL II

Distribuţia lipidelor în o serie de biomembrane
(Date reunite din literatură de M. Tao, 1982) (63)

Membrana	Fosfolipide	Colesterol	Glicolipide
	Masa % din lipidele totale		
Eritrocit de om	73	25	5
Eritrocit bovin	70	30	5
Eritrocit de porc	63	28	12—14
Eritrocit de şobolan	67	24,7	8,3
Ficat de şobolan:			
— membrană plasmatică	57	22	8
— lizozomi	69,5	22	—
— reticul endoplasmic	85	6,5	—
— complex Golgi	54	12	—

Toate lipidele din membrană sînt molecule amfifile (sau amfipatice), avînd o parte (coadă), adesea preponderentă, hidrofobă (apolară) şi o parte (cap) hidrofilă, polară sau ionică. Acest caracter amfipatic le conferă o proprietate fundamentală în dispunerea lor la nivelul biomembranei. Astfel, dispersate după extracţia din membrană, în soluţii apoase lipidele formează spontan micele sau structuri bilamelare, datorită agregării porţiunilor apolare sau hidrofobe. Zonele polare sau hidrofile vor rămîne la exterior, expuse mediului apos (fig. 1).

Deşi tipurile lipidice de bază descrise sînt limitate ca număr, în realitate varietatea lipidelor membranare este foarte mare. Se apreciază că numărul de lipide diferite structural existent în diferite biomembrane corespunde la cîteva zeci de mii (33). Totuşi, deoarece conţinutul în informaţie al molecu-

Scanned with OKEN Scanner

lelor depinde de numărul de configurații posibile, influența varietății lipidelor asupra proprietăților biomembranelor este limitată. Aceasta, evident, în comparație cu proteinele. Afirmația nu trebuie acceptată exclusivist, deoarece compoziția în lipide rămîne determinantă, așa cum se va vedea, în condiționarea unor parametri biofizici ai biomembranelor: fluiditatea, încărcarea

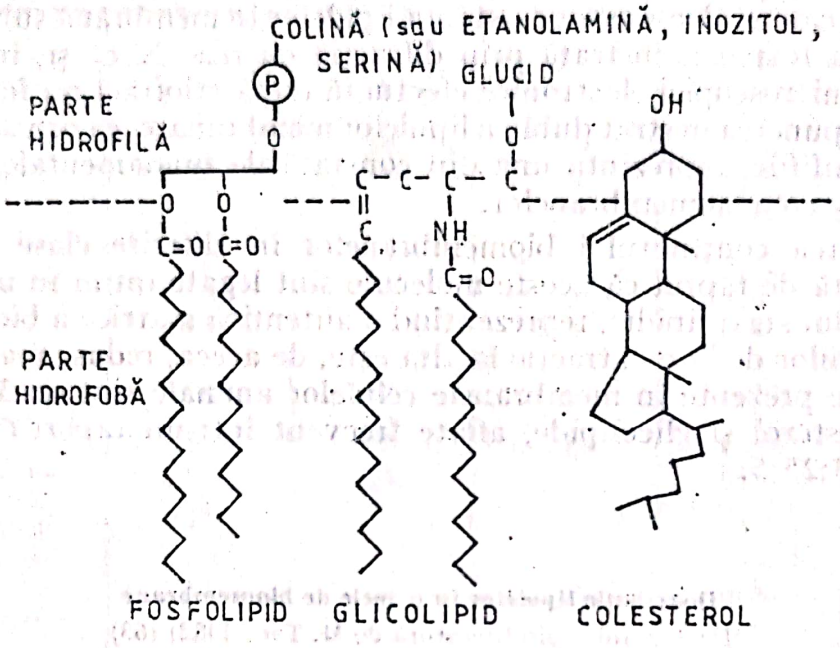


Fig. III. 1 — Reprezentare a caracterului amfipatic al moleculelor lipidice componente ale biomembranelor.

electrică, permeabilitatea pentru substanțele lipofile și, cel puțin parțial, pentru apă, ca și interacțiunile cu proteinele. Se poate afirma chiar că, datorită cunoașterii extrem de aprofundate a lipidelor, datele referitoare la patologie sînt mult mai certe, în raport cu patologia indusă de alterarea proteinelor membranei (19).

Cu aproximație, pe o secțiune cu aria de 1 μm^2 există 5×10^6 molecule lipidice, ceea ce ar însemna pentru întreaga membrană a unei celule animale mici circa 10^9 molecule lipidice.

1.1. Structura diferitelor clase de lipide din membrana plasmatică

Structura moleculară a celor trei categorii de molecule, fosfolipide, glicolipide și colesterol prezintă o caracteristică comună: existența unor zone polare (hidrofile) și apolare (hidrofobe), exprimate printr-un cap hidrofil și o coadă hidrofobă, conectate printr-o zonă de polaritate intermediară. De aici rezultă tendința moleculelor amfifile de a agrega în structuri complexe pentru reducerea interacțiunilor nefavorabile cu solventul. Structura agregatelor depinde deopotrivă de caracterul amfifil al moleculelor și de solvent. În apă, mediul obișnuit al celulelor vii, fosfolipidele și glicolipidele — dar nu și colesterolul — se dispun spontan în strat dublu, dacă solventul este prezent în exces. Structurile lamelare formate au, deci, o grosime de două molecule pla-

Scanned with OKEN Scanner

sate astfel încît capetele polare hidrofile se află la exteriorul celor două fețe expuse mediului apos, iar cozile apolare hidrofobe sînt „ascunse" în miezul lamelei. În acest mod este evitat contactul cu apa, defavorabil energetic (fig. 2)

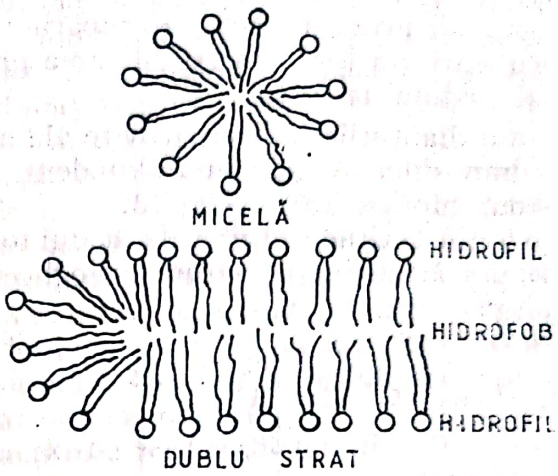


Fig. III. 2 — Micele și strat dublu lipidic — două alternative în care se dispun fosfolipidele (și alte molecule amfipatice) spontan, în medii apoase.

TABEL III

Compoziția în fosfolipide a unor biomembrane
(Date din literatură, reunite de M. Tao., 1982) (63)

Membrana	PC	PE	PS	PI	PA	SP	CL	LPC	LPE	PG
Eritrocit										
— uman	26	30,1	8,2	8,2	n	27,4	n	n	n	n
— bovin	0	30	11,4		n	58,6	n	n	n	n
— porc	25,4	41,3	7,9	1	n	25,4	n	n	n	n
— șobolan	47,5	21,5	10,8	3,5	0,3	12,8	n	3,8	n	n
Ficat de șobolan										
— plasmalemă	34,9	18,5	9,0	7,3	4,4	17,7	urme	3,3	n	n
— membrane intracelulare:										
— nucleu	61,4	22,7	3,6	8,6	1	3,2	0	1,5	0	n
— membrană internă mitocondrie	45,4	25,3	0,9	5,9	0,7	2,5	17,4	n	n	2,1
— membrană externă mitocondrie	49,7	23,2	2,2	12,6	1,3	5,0	3,4	n	n	2,5
— aparat Golgi	45,3	17,9	4,2	8,7	n	12,3	n	5,9	6,3	n
— reticul endoplasmic rugos	60,9	18,6	3,3	8,9	1,0	3,7	n	4,7	0	n
— lizozom	33,7	17,9	8,9	8,9	6,8	32,9	6,8	0	n	n

Notă; Valorile sînt exprimate în procente din fosfolipidele totale. *Abrevieri:* PC — fosfatidilcolină; PE — fosfatidiletanolamină; PS — fosfatidilserină; PI — fosfatidilinozitol; PA — acid fosfatidic; SP — sfingomielină; CL — cardiolipină; LPC — lizofosfatidilcolină; LPE — lizofosfatidiletanolamină; PG — fosfatidilglicerol; n = nedeterminată.

Scanned with OKEN Scanner

1.1.1. *Fosfolipidele*

Fosfolipidele (sau fosfogliceridele) reprezintă moleculele lipidice cele mai abundente, în toate tipurile de membrane biologice. Ele derivă din glicerol, prin esterificarea grupărilor hidroxil în pozițiile 1 și 2 ale glicerolului cu acizi grași și prin esterificarea grupării hidroxil în poziția 3 cu un derivat al acidului fosforic.

Lanțurile hidrocarbonate ale acizilor grași au lungimi și grade de nesaturare diferite. Cele mai abundente prezintă un număr par de atomi de carbon, cuprins între 14 și 22.

Substituentul fixat la acidul fosforic (notat cu X în formula generală din figura 3) definește natura fosfogliceridului. Fosfolipidul cel mai simplu este

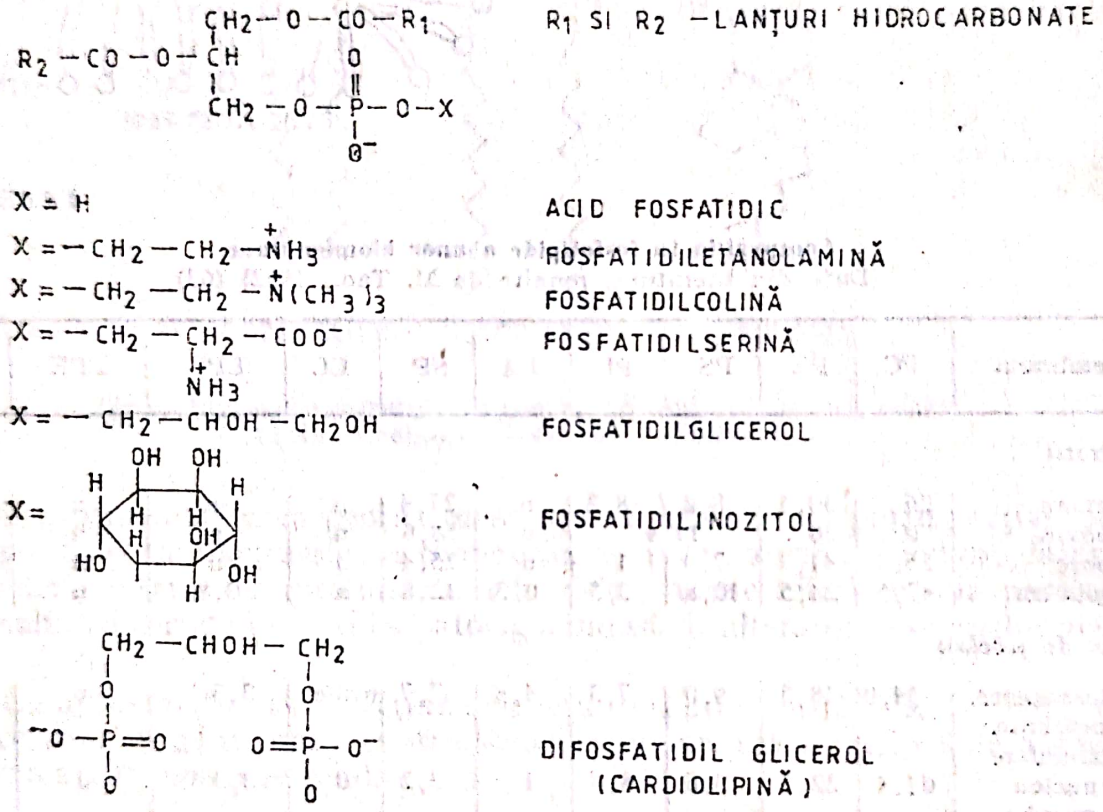


Fig. III. 3 — Formula chimică a principalelor fosfolipide din dublul strat lipidic al membranei.

acidul fosfatidic, esterificat pe grupul hidroxil în poziția 3 a glicerolului prin acid fosforic. Acesta nu este un fosfolipid membranar, ci un intermediar în biosinteza altor fosfogliceride care posedă un substituent (X) la nivelul acidului fosforic. Fosfolipidele cele mai importante din stratul dublu lipidic al membranei sînt următoarele: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerolul (PG), fosfatidilinozitolul (PI) și difosfatidilglicerolul sau cardiolipina (CL), formată din asocierea a două molecule de acid fosfatidic prin intermediul unei molecule de glicerol.

Gruparea fosforil a fosfolipidelor este ionizabilă, cu un pK cuprins între 1 și 2, fiind încărcată negativ la pH-ul fiziologic. Sarcina globală a unui fosfo-

Scanned with OKEN Scanner

lipid va depinde de natura substituentului X. Evident, dacă substituentul este neutru, fosfogliceridul va fi încărcat negativ (PG, PI, PS). Dimpotrivă, dacă substituentul poartă o sarcină pozitivă fosfolipidul este neutru (PC, PE).

Toate fosfogliceridele prezintă o parte apolară (lanțurile hidrocarbonate) și o parte polară (fosfoglicerolul subtituit) distincte spațial, de unde caracterul amfifil al acestor molecule. Partea apolară limitează puternic solubilitatea în apă, iar de la o concentrație de 10^{-10} M pentru fosfolipidele menționate (extrase din membrane), nu se va mai produce solubilizarea sub formă de monomeri. Ca urmare, moleculele în exces se asociază într-o structură ce le permite limitarea la maximum a contactului între părțile lor polare și apa în care se află în suspensie. Tipul de structură depinde de așa-numita ,,balanță hidrofil-hidrofobă", dată de dimensiunile relative ale părților hidrofile și hidrofobe. Fosfogliceridele vor adopta o structură veziculară în dublu strat, cu zonele apolare în contact în interiorul acestuia, unde apa nu are acces direct, iar cu zonele polare în contact, de o parte și de alta a dublului strat, cu mediul apos înconjurător. Această structură în strat dublu adoptată spontan de fosfolipide reprezintă structura de bază, *matricea* membranelor biologice (77).

Fosfolipidele pot fi hidrolizate sub acțiunea fosfolipazelor (fig. 4). Acestea reprezintă un mijloc prețios pentru cercetare, utilizarea lor permițînd analiza punctuală în scopul determinării structurii fine a lipidelor. În particu-

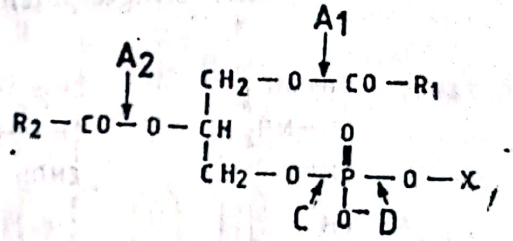


Fig. III. 4 — Locurile de acțiune a fosfolipazelor A_1, A_2, C și D.

lar, fosfolipazele A_1 și A_2 provoacă eliminarea acizilor grași situați în pozițiile 1 și 2 ale glicerolului, conducînd la formarea lizofosfolipidelor, care au o ,,balanță hidrofil-hidrofobă" diferită de cea a fosfolipidelor, fiind mai solubile în apă. Ca urmare, de la o anumită concentrație, denumită concentrație micelară critică, lizofosfolipidele adoptă o structură micelară, în care părțile polare tapisează suprafața micelelor și separă interiorul hidrofob alcătuit din lanțurile hidrocarbonate și exteriorul apos.

Fosfatidilcolinele (PC), cu rol de prim plan cantitativ și calitativ, denumite în trecut și lecitine, conțin în general două molecule diferite de acizi grași, una saturată și alta nesaturată.

PC de origine exogenă, datorită caracterului nesaturat, posedă o mare disponibilitate în a servi ca sursă de aprovizionare cu fosfolipide și lipoproteine normale la om. De aici decurge interesul considerabil care li se acordă în terapeutică.

Faptul că PC neutre sînt mai abundente la nivelul stratului extern al membranei iar cefalinele încărcate negativ în stratul intern, are o mare importanță funcțională în celulele și prelungirile nervoase. Există probe care demonstrează rolul lor primordial în reînnoirea fracțiunilor lipidice în membrană. Conținutul în fosfolipide al membranelor plasmatică și intracelulare apare relativ constant, cu modificări mici sau fără nici o relație cu dieta. Dimpotrivă, compoziția în acizi grași poate fi alterată prin variațiile cantitative ale acizilor grași din alimentație. De exemplu, a fost provocată experimental o creș-

tere a acidului linoleic din plasmalema hepatocitelor la șobolan (29). Mai multe linii celulare animale s-au dovedit, *in vitro*, utile în studiul alterărilor controlate ale componentei lipidice din biomembrane (25). De interes este și efectul provocat de înlocuirea unor fosfolipide, asupra enzimelor asociate membranei. Astfel, activitatea bazală a adenilatciclazei la celulele cultivate în mediu cu etanolamină și linoleat este de 4 ori mai mare decît la același tip de celule aflate în mediu cu colină (21).

1.1.2. *Sfingolipidele*

Reprezintă o clasă de lipide de o foarte mare diversitate. Date foarte multe din cadrul patologiei atestă frecvent modificările sfingolipidelor, de unde necesitatea cunoașterii structurii diferitelor tipuri mult mai extinsă decît permite această prezentare sintetică.

Constituentul de bază al sfingolipidelor este sfingozina sau unul din derivații săi. Prin amidifierea sa la gruparea NH_2 cu un acid gras cu lungimea lanțului și gradul de nesaturare variabile rezultă ceramida (fig. 5 a și b), compus ce reprezintă baza tuturor sfingolipidelor. Acestea sînt obținute prin adiția unui substituent la funcția alcool primar a ceramidei (notată cu X în figura 5 b). Ca și fosfolipidele, sfingolipidele sînt molecule amfifile.

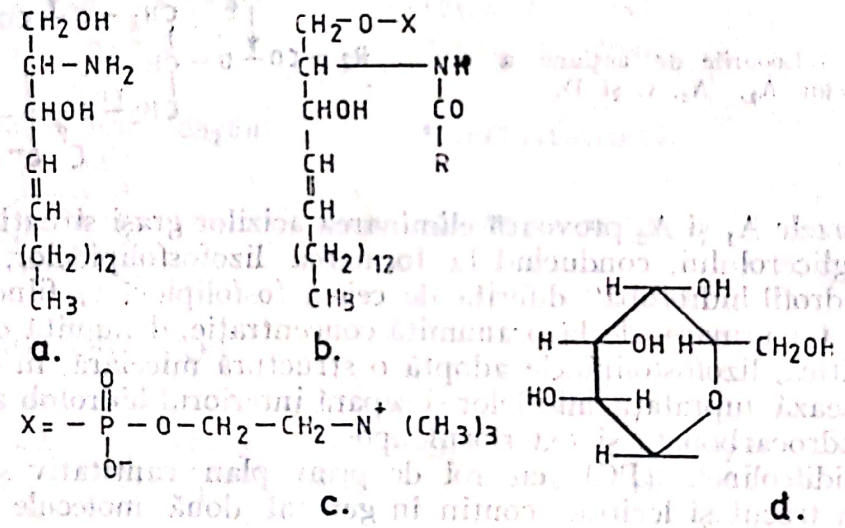


Fig. III. 5 — Formele chimice ale unor sfingolipide; a) sfingozina; b) ceramida (x = H, R = lanț hidrocarbonat de 18—24 atomi de carbon); c) sfingomielina; d) un galactocerebrozid.

În funcție de natura substituentului de la nivelul ceramidei, se disting trei clase de sfingolipide: a) sfingomielinele; b) glicosfingolipidele neutre; c) glicosfingolipidele acide.

Sfingomielinele rezultă din esterificarea ceramidei, pe funcția alcool primar, printr-un derivat al acidului fosforic, de pildă, fosforiletanolamina sau fosforilcolina (fig. 5 c). Ele au proprietăți asemănătoare cu PE și PC. Rolul lor este considerabil la nivelul membranelor mielinice.

Glicosfingolipidele neutre sau glicozilceramidele rezultă în urma atașării la funcția alcool primară a ceramidei, printr-o legătură glicozidică, a

Scanned with OKEN Scanner

glucozei, galactozei sau a unui polizaharid (di, tri sau tetrahexoză). Rezultă astfel o mare diversitate de glicosfingolipide. Deoarece au fost izolate inițial din lipidele creierului, sînt denumite frecvent și *cerebrozide*, dar ulterior au fost regăsite într-o mare varietate de țesuturi. Prin partea lor polară participă la structura dublului strat lipidic. Partea glicozidică formează o structură liniară sau ramificată, de tip oligozaharidic, fiind hidrofilă. Proiectată spre exteriorul membranei, este implicată în numeroase funcții de recunoaștere, exemplul cel mai studiat fiind specificitatea grupelor sanguine.

Glicosfingolipidele acide reprezintă derivați de glicosfingolipide neutre. Ele conțin una sau mai multe grupe de acid sialic, cel mai curent fiind acidul N-acetil neuraminic. De o mare varietate, sînt prezente în concentrații crescute în celulele ganglionilor, de unde și denumirea lor comună de *gangliozide*. Ele conțin lanțuri ramificate complexe, de pînă la 7 unități glucidice și intervin, de asemenea, în numeroase funcții de recunoaștere celulară (fig. 6).

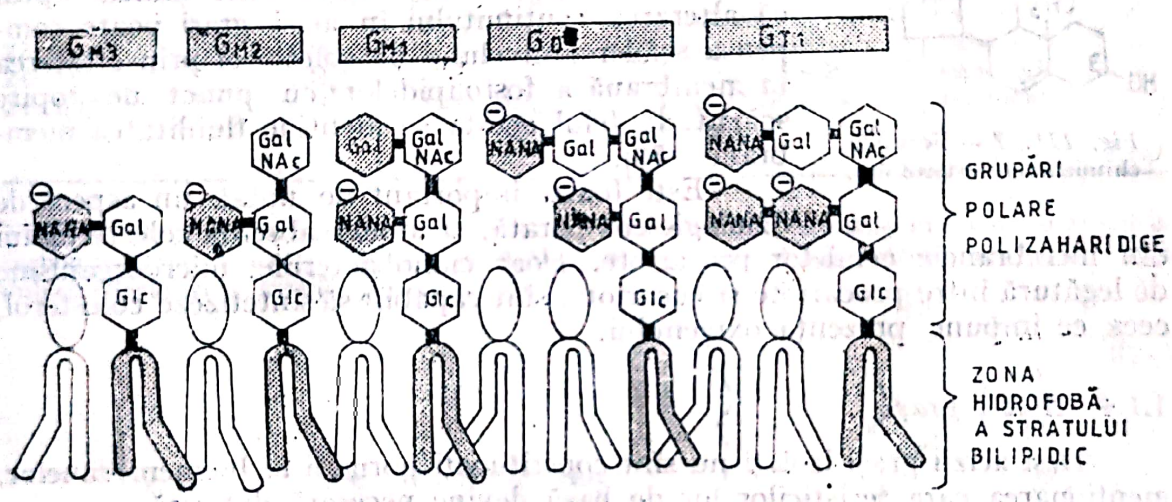


Fig. III. 6—Cîteva gangliozide reprezentative cu nomenclatura lor standard, propusă de Svennerholm. În simbolurile G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}, G_{D1} și G_{T1}, literele M, D și T indică numărul de resturi de acid sialic (mono, di și, respectiv, tri). Numărul care urmează după literele M, D sau T este obținut scăzînd din 5 numărul de resturi glucidice neîncărcate electric. Simbolurile glucidelor menționate în schemă sînt: NANA = acid N-acetilneuraminic, denumit și acid sialic; Gal = galactoză; Glc = glucoză; GalNAc = N — acetilgalactozamină. Ultimele 3 sînt neîncărcate, în timp ce NANA (desenat pe fond gri) poartă o sarcină negativă (După B. Alberts și colab., 1986) (1).

1.1.3. *Colesterolul*

Colesterolul reprezintă, alături de fosfolipide, un component lipidic major al membranei (tabel II). Este un steroid care derivă din perhidropentanofenantren, o hidrocarbură tetraciclică saturată (fig. 7). Molecula sa, în formă de disc, sau „farfurie", constituită din patru cicluri carbonate acolate care îi conferă o anumită rigiditate, este hidrofobă. Singura parte polară, deci hidrofilă, a moleculei este gruparea OH a C_3 din cadrul ciclului carbonat A.

Colesterolul, moleculă mult mai compactă decît cea a fosfolipidelor sau sfingolipidelor, se inseră în dublul strat lipidic, prezentînd gruparea sa OH la interfață și interacționînd cu lipidele vecine. El exercită un efect de reducere a supleței și permeabilității dublului strat.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetări efectuate pe culturi de celule au demonstrat dependența supraviețuirii de achiziția colesterolului din mediu sau ca rezultat al sintezei *de novo* în unele celule (8). Colesterolul reprezintă, deci, una dintre lipidele indispensabile vieții celulare, în mod cu totul particular la nivelul membranei celulare. Cea mai mare parte a celulelor din organism utilizează în acest scop colesterolul furnizat prin sîngele circulant din rețeaua capilară în contact cu țesuturile.

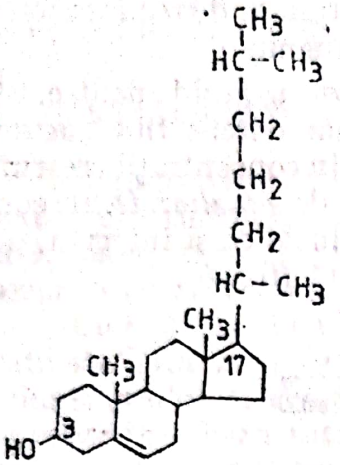


Fig. III. 7 — Formula chimică a colesterolului.

A devenit posibilă manipularea conținutului celular în steroli. De asemenea s-a stabilit că depleția în colesterol poate exercita efecte asupra compoziției în fosfolipide de la nivelul membranei. Astfel, la șoarecele LM cu celule defective în sinteza colesterolului, nivelul scăzut al colesterolului conduce la creșterea conținutului în acizi grași nesaturați la nivelul fosfolipidelor, ca și a raportului molar PC/PE (23). Studii subsecvente indică faptul că alterarea conținutului în acizi grași poate compensa scăderea nivelului de colesterol prin creșterea în membrană a fosfolipidelor cu punct de topire scăzut. În felul acesta se menține fluiditatea membranei (50).

Este foarte important de notat un aspect de fiziologie comparată, și anume absența colesterolului din membranele celulelor procariote. Doar cianobacteriile, microorganisme de legătură între procariote și eucariote, sînt capabile să sintetizeze colesterol, ceea ce impune prezența oxigenului.

1.1.4 *Acizii grași*

Deși acizii grași izolați nu sînt constituenți normali ai biomembranelor, menționarea caracteristicilor lor de bază devine necesară datorită intervenției în determinarea unor proprietăți biofizice fundamentale. În membrană ei se află sub formă de esteri asociați la partea polară a lipidelor. Cel mai important rol al acizilor grași constă în faptul că, prin lungimea și gradul lor de nesaturare, definesc fluiditatea membranei. Fluiditatea, așa cum se va vedea ulterior, joacă un rol important în expresia funcțiilor membranei.

Prin hidroliza lipidelor izolate din membrane se obține un număr mare de acizi grași, saturați și nesaturați (cu 1—4 duble legături) cu lungimi variind de la 12 la 24 atomi de carbon (tabel IV). Principalii acizi grași componenți ai fosfolipidelor sînt: C_{16} (palmitic), C_{18} (stearic), $C_{18:1}$ (oleic) și $C_{18:2}$ (linoleic). Acidul arachidonic ($C_{20:4}$) este, de asemenea, un constituent al fosfolipidelor, cu importanță particulară, fiind utilizat ca substrat în sinteza de prostaglandine (55).

Structurile acizilor grași saturați în *cis* sînt diferite. În configurația cea mai stabilă, acizii grași saturați au lanțurile hidrocarbonate etirate. Prezența unei duble legături în *cis* antrenează, începînd de la nivelul acesteia, o modificare a direcției lanțului de circa 30°. Dimpotrivă, acizii grași prezentînd o nesaturare în *trans* au configurații vecine cu cele ale acizilor grași saturați (fig. 8).

Punctul de topire al acizilor grași depinde de gradul de nesaturare și de lungimea lanțului. La lungime egală, punctul de fuziune este cu atît mai redus

Scanned with OKEN Scanner

TABEL IV

Nomenclatura celor mai importanți acizi grași

Simbol numeric	Structură $H_3C-[R]_n-COOH$	Denumire sistematică	Nume comun
14: 0	$-[CH_2]_{12}-$	tetradecanoic	miristic
16: 0	$-[CH_2]_{14}-$	hexadecanoic	palmitic
16: 1(9)	$-[CH_2]_5CH=CH[CH_2]_7-$	9-hexadecanoic	palmitoleic
18: 0	$-[CH_2]_{16}-$	octadecanoic	stearic
18: 1(9)	$-[CH_2]_7CH=CH[CH_2]_7-$	cis-9-octadecenoic	oleic
18: 2(9,12)	$-[CH_2]_3[CH_2CH=CH_2]CH_2]_7-$	cis,cis-9,12-octadecadienoic	linoleic
18: 3(9,12,15)	$-[CH_2CH=CH]_3[CH_2]_7-$	9,12,15-octadecatrienoic	(9,12,15)-linolenic
20: 0	$-[CH_2[_{18}-$	icosanoic	arachidic
20: 4(5,8,11,14)	$-[CH_2]_3[CH_2CH=CH]_4[CH_2]_3-$	5,8,11,14-icosatetraenoic	arachidonic
22: 0	$-[CH_2]_{20}-$	docosanoic	behenic
24: 0	$-[CH_2]_{22}-$	tetracosanoic	lignoceric
24: 1(15)	$-[CH_2]_7CH=CH[CH_2]_{13}-$	cis-15-tetracosenoic	nervonic

Notă; Cifrele simbolului numeric au următoarea semnificație: prima — numărul de atomi de carbon din lanț; a doua — numărul de duble legături; cifrele din paranteză precizează poziția dublelor legături în lanțul atomilor de carbon.

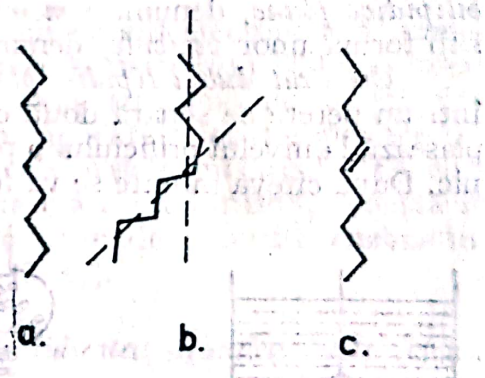


Fig. III. 8 — Configurația acizilor grași:
a) saturată; b) nesaturată în *cis*;
c) nesaturată în *trans*.

cu cît gradul de nesaturare este mai crescut. Nesaturarea în *cis* scade net punctul de fuziune în raport cu nesaturarea în *trans*.

Raportul acizi grași nesaturați /saturați depinde de activitatea enzimelor asociate membranei. Inhibarea Mg-ATP-azei prin intermediul fluorurilor demonstrează acest fapt. Corelația se măsoară prin raportul dublelor legături/acizi grași saturați (22). Raportul crește la nivelul ficatului diabeticilor, dar scade în cirozele alcoolice prin deficiențe în linoleat și linolenat (9).

1.2. Caracteristicile esențiale ale stratului dublu lipidic

În continuare, vom prezenta o serie de proprietăți fundamentale ale componentului de bază al plasmalemei.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1. *Formare spontană (autoorganizare)*

Datorită caracterului amfipatic descris anterior, fosfolipidele și glicolipidele formează spontan, în mediu apos, straturi duble. Formarea matricei lipidice a biomembranelor este deci un proces de *autoasamblare*. În plus, odată formate straturile duble lipidice au tendința să delimiteze compartimentele închise, evitîndu-se contactul cu apa a cozilor hidrofobe aflate la extremitățile stratului dublu. Se produce astfel o *autoînchidere*, în urma căreia rezultă vezicule. Dacă peretele veziculei este dezagregat (spart) într-o zonă limitată, proprietatea de autoînchidere se menține, vezicula refăcîndu-se.

Interacțiunile hidrofobe constituie principala forță ce conduce la formarea straturilor duble lipidice. După Stryer moleculele de apă sînt îndepărtate de la nivelul „cozilor" hidrocarbonate ale lipidelor, în momentul cînd acestea sînt cuprinse în stratul dublu. Eliberarea de apă are ca rezultat o creștere mare a entropiei. În plus, există forțe de atracție van der Waals între „cozile" hidrocarbonate, care vor favoriza aglomerarea intimă a acestora. În fine, se adaugă interacțiuni electrostatice și legături de hidrogen favorabile, între capetele polare și moleculele de apă. Rezultă astfel un adevărat arsenal complet de forțe care mediază interacțiunile moleculare în biomembrane (60).

Aceste proprietăți se exprimă și *in vitro* unde fosfolipidele extrase din biomembrane se dispun spontan în strat dublu, obținîndu-se astfel membrane artificiale. Adevăratele modele simplificate, dar păstrînd o serie de proprietăți ale matricei lipidice din biomembrane, membranele artificiale și-au probat utilitatea atît în cercetare cît și în practică. În studiile experimentale sînt utilizate în mod particular două tipuri de straturi duble lipidice: 1) *straturi bilipidice plane*, denumite *membrane negre*; 2) straturi duble lipidice dispuse sub forma unor *vezicule*, denumite *lipozomi*.

Un *strat dublu lipidic plan* se poate obține printr-un orificiu existent într-un perete ce separă două compartimente apoase. Pentru obținerea sa se plasează la nivelul orificiului o picătură lipidică dizolvată într-un solvent organic. După cîteva minute se va forma un film bilipidic care nu reflectă lumina,

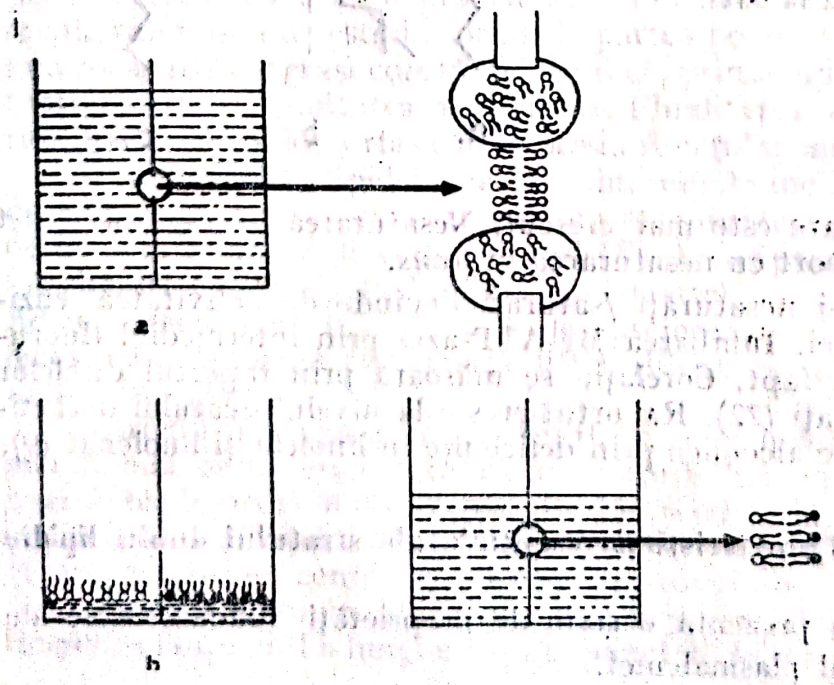


Fig. III. 9 — Obținerea de membrane artificiale bilipidice: a) strat dublu cu o singură specie de lipide; b) strat dublu asimetric, format din două specii de lipide diferite. (După E. Shechter, 1984) (55).

deci este negru. Aceste membrane au 5—9 nm grosime și apar la microscopul electronic sub forma unei imagini trilamelare, asemenea biomembranelor. Totodată prezintă o serie de proprietăți biofizice comparabile cu cele ale membranelor naturale, dar diferă prin permeabilitatea redusă și rezistență electrică mare (fig. 9). Prin încorporarea unor proteine pot să se apropie și mai mult ca proprietăți de biomembrane (18).

În soluții apoase, fosfolipidele dispuse în strat dublu formează spontan lipozomi multilamelari, de circa 2 μm diametru. Formarea poate fi accelerată prin agitare mecanică. Un lipozom obținut astfel este multilamelar, rezultînd din mai multe straturi, separate de apă. Lipozomii multilamelari pot fi transformați, prin tratare cu ultrasunete, în lipozomi unilamelari, delimitați de un singur strat dublu lipidic (fig. 10). Diametrul lor tipic este de 30 nm, dar poate

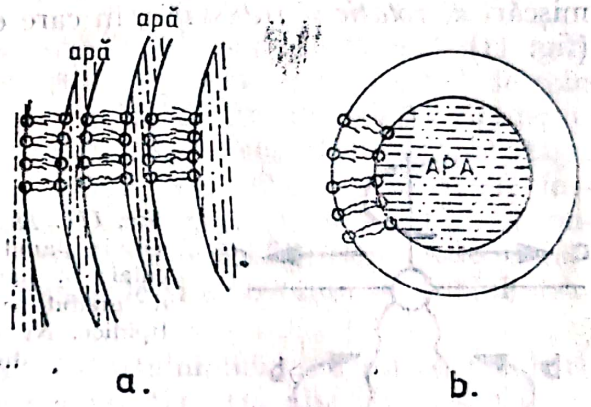


Fig. III. 10 — Tipuri de lipozomi: a) lipozom multilamelar; b) lipozom unilamelar.

varia funcție de condițiile de obținere. Lipozomii permit efectuarea a numeroase experiențe de reconstituire a funcțiilor membranare prin adiția și inserția controlată, la nivelul stratului bilipidic, a uneia sau a mai multor proteine membranare. De o importanță particulară sînt aplicațiile lor terapeutice. Ei permit vehicularea substanțelor medicamentoase în sistemul circulator și dirijarea acestora către țesuturile țintă. O dezvoltare a acestei utilități constă în obținerea de „celule" artificiale care printr-o serie de secvențe enzimatice încorporate ar putea fi utilizate în terapeutică (3, 47).

1.2.2. *Fluiditatea stratului dublu lipidic*

În ultima decadă, au fost investigate cu un mare rafinament tehnic și minuțiozitate mișcările moleculelor lipidice, atît pe membrane artificiale cît și la nivelul membranelor naturale. Frecvența și amplitudinea diferitelor tipuri de mișcări intramoleculare sau moleculare de la nivelul lipidelor sînt reflexul atît al parametrilor de structură moleculară, caracteristică fiecărei clase de lipide, cît și al interacțiunii dintre moleculele cuprinse în stratul dublu lipidic. Pentru exprimarea globală a efectului tuturor tipurilor de mișcări ale moleculelor de lipide asupra proprietăților stratului bilipidic s-a introdus termenul de viscozitate sau reciprocul său, fluiditate. Dublul strat lipidic posedă, deci, o fluiditate care este rezultatul mișcărilor lipidelor la scară redusă, în principal rotația lipidelor în jurul propriei axe moleculare și a lanțurilor hidrocarbonatei Fluiditatea este cu atît mai mare cu cît aceste mișcări sînt mai importante și are drept consecință mișcările laterale ale lipidelor și proteinelor în planul membranei.

Scanned with OKEN Scanner

Proprietatea capitală a majorității moleculelor lipidice de a difuza liber în stratul dublu lipidic a fost relevată clar abia imediat după anul 1970. În ultimii ani, mișcarea lipidelor în bistrat a constituit obiectul a multiple investigații extrem de aprofundate, cu o varietate de tehnici fizice ca: rezonanța electronică de spin (RES), rezonanța magnetică nucleară (RMN), polarizarea fluorescenței, ca și prin spectroscopie în infraroșu și Raman. Toate aceste tehnici impun, îndeosebi în ceea ce privește prelucrarea și interpretarea datelor, un amplu edificiu teoretic (11, 66).

În ciuda unor controverse în interpretarea rezultatelor, tehnicile amintite au deschis o nouă cale de acces în cunoașterea dinamicii, organizării și asamblării membranei la nivel atomic și molecular.

Mișcările moleculelor lipidice în cadrul stratului dublu sînt de două tipuri: a) *intramoleculare*, prin care se mișcă doar o porțiune a moleculei; b) mișcări *de rotație și translație*, în care este angajată molecula în întregul său (fig. 11).

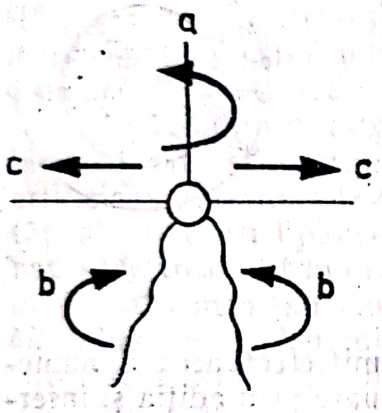


Fig. III. 11 — Diferitele mișcări ale unei molecule fosfolipidice în planul membranei: a) mișcarea de rotație în axul moleculei; b) mișcări ale lanțurilor de acizi grași în funcție de gradul de nesaturare; c) difuziune laterală a moleculei lipidice. Nu este figurată mișcarea de basculare (*flip-flop*) dintr-un strat monolipidic în altul.

Mișcările intramoleculare sînt corelate intim cu structura biochimică a lipidelor. Ele implică rotația grupurilor de atomi în jurul legăturilor simple, mișcări segmentare la nivelul lanțurilor de acizi grași și modificări de conformație ale grupărilor capetelor polare.

Mișcările de rotație și translație sînt mai „accesibile" investigației. Mișcarea de rotație angajează fiecare moleculă lipidică și este foarte rapidă ($\sim 10^{-6}$ —10^{-9} sec). În acest caz, moleculele se rotesc în jurul axelor lor, iar datorită flexibilității lanțurilor hidrocarbonate se produce o flexiune a moleculei cu maximum la nivelul centrului stratului dublu și mai redusă la nivelul „capului" lipidic polar. La rîndul lor, mișcările de translație sînt de două tipuri: o translație laterală și o migrare a moleculelor lipidice dintr-un strat în altul. Prin translația laterală, moleculele lipidice își schimbă ușor locul cu moleculele vecine, în interiorul monostratului lipidic respectiv de circa 10^7 ori pe secundă. Aceasta dă naștere la o difuziune laterală rapidă, al cărei coeficient de difuziune (D) este în medie de 10^{-8} cm^2 $secundă^{-1}$. Înseamnă că într-o secundă, o moleculă lipidică medie poate difuza pe întreaga lungime a unei bacterii de dimensiuni mari ($\sim$ 2 μm). Migrarea moleculelor lipidice dintr-un strat în altul este mult mai redusă. Printr-un mecanism de basculă, denumit „*flip-flop*", o moleculă lipidică individuală poate migra în 7—14 zile dintr-un monostrat lipidic în altul (49, 61) (fig. 12). Pentru a oferi un exemplu legat de modul în care pot fi măsurate mișcările moleculelor lipidice ne vom referi la utilizarea în acest scop a RES. În acest caz moleculele paramagnetice avînd un elec-

Scanned with OKEN Scanner

tron nepereche, celibatar, plasate într-un cîmp magnetic, absorb radiația electromagnetică de o frecvență de ordinul 10^9 Hz. Relația între frecvența radiației absorbite (ν) și cîmpul magnetic (H) este dată de ecuația: $h\nu = g\beta H$, unde β este constant (magnetonul Bohr) iar g este constantă spectroscopică, depinzînd de mediul învecinat electronului celibatar. Spectrul de absorbție se poate

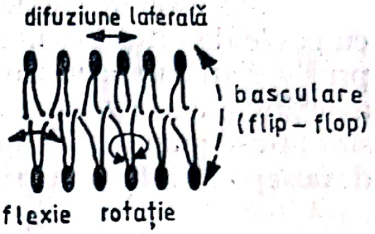


Fig. III. 12 — Mișcările moleculelor de fosfolipide în cadrul stratului bilipidic.

obține variind intensitatea cîmpului magnetic la frecvență constantă. În cazul moleculelor lipidice este necesară în prealabil marcarea cu o „sondă" de spin care conține electroni celibatari, ce pot fi urmăriți ulterior solidar cu mișcarea moleculei, prin intermediul spectrelor obținute. Se poate, de exemplu atașa, printr-un procedeu preparator prealabil, capului polar al unei molecule de fosfolipid un marcher de spin ce conține un radical nitroxil. Acesta din urmă conține un electron nepereche al cărui spin creează un semnal paramagnetic detectabil prin RES. Astfel pot fi măsurate mișcările și orientarea în dublul strat ale moleculei marcate.

Caracterul de fluid bidimensional al stratului bilipidic este dependent, în afară de mișcările moleculelor, și de compoziția stratului dublu lipidic.

Fosfolipidele intervin prin inducerea la nivelul stratului bilipidic a tranzițiilor de fază termotropice. O membrană artificială la nivelul căreia este dispus în strat dublu un singur tip de fosfolipid trece din starea de cristal lichid în stare cristalină rigidă (sau gel) la un punct de congelare precis și caracteristic. Schimbarea de stare se numește tranziție de fază. Ea depinde de natura părții polare, adică, pentru un lipid dat de natura lanțurilor hidrocarbonate. Acestea pot adopta două conformații diferite: una dezordonată, de tip α, orientarea medie a lanțurilor fiind perpendiculară la stratul dublu lipidic și alta ordonată, în care lanțurile sînt rigide și întinse, fie perpendicular pe stratul bilipidic (conformație β), fie înclinate (conformație β'). Deoarece conformația lanțurilor depinde în primul rînd de temperatură, cînd aceasta scade suficient

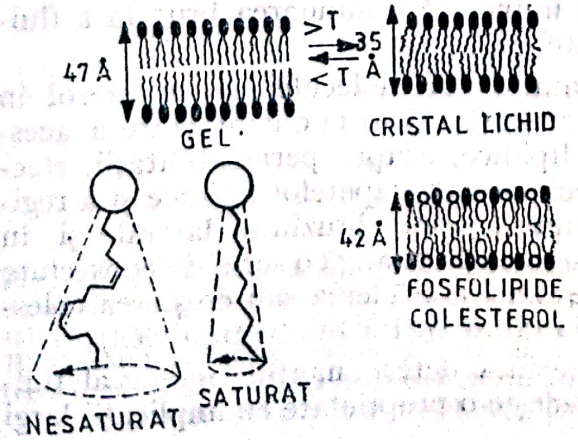


Fig. III. 13 — Trei factori majori care afectează starea de cristal lichid a stratului dublu lipidic: gradul de nesaturare al acizilor grași, conținutul în colesterol și temperatura.

se va produce trecerea de la conformația α la tipul β sau β'. Temperatura la care survine tranziția de fază este cu atît mai joasă cu cît lanțurile hidrocarbonate sînt mai scurte sau posedă mai multe legături duble. Aceasta deoarece lanțurile scurte reduc tendința de interacțiune a cozilor hidrocarbonate, iar în cazul legăturilor duble cis în lanțurile hidrocarbonate se formează noduri, care fac asamblarea lor dificilă (52, 55).

Este ușor de înțeles că dacă o membrană artificială conține fosfolipide cu grade de saturare diferite și, deci, temperaturi de tranziție de fază diferite, prin variația temperaturii se poate produce o separare de fază. Fosfolipidele aparținînd aceluiași grup vor trece pe rînd în starea de gel în momentul cînd sînt atinse punctele lor de congelare. Segregarea lipidelor în cursul tranzițiilor de fază poate fi demonstrată cu ușurință la nivelul unui amestec de două lipide

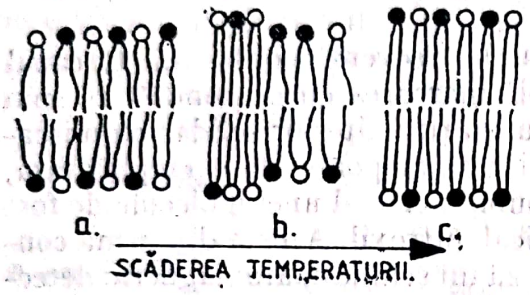


Fig. III. 14 — Segregarea lipidică în cursul tranziției de fază a unui amestec de două lipide. Lipidul A (cerculeț negru) temperatura de tranziție T_a; lipidul B (cerculeț alb), temperatura de tranziție T_b ($Ta < T_b$).

(fig. 14). Acest tip de separație nu se poate produce în cazul biomembranelor, deoarece de obicei la aceeași moleculă lipidică un lanț de acid gras este saturat, iar altul, nesaturat. De aceea, în membrana vie tranzițiile de fază vor fi mai complexe, fiind perturbate de alți constituenți care nu participă la tranziții, respectiv colesterolul și proteinele (55).

Un alt determinant al fluidității membranei este *colesterolul*, care poate ajunge ca număr de molecule în membrană la paritate cu fosfolipidele. În afară de rolul în reglarea fluidității, colesterolul crește stabilitatea bistratului. Moleculele de colesterol sînt orientate cu grupările hidroxil în proximitatea grupărilor polare ale moleculelor de fosfolipide. Nucleele lor steroide, în formă de „farfurie" interacționează cu regiunea lanțurilor hidrocarbonate cea mai apropiată de grupările polare ale capului lipidic, lăsînd restul lanțului flexibil. Rezultă astfel o imobilizare parțială a fosfolipidelor. La concentrațiile obișnuite din membrane, colesterolul exercită astfel o obstrucție a apropierii și cristalizării lanțurilor hidrocarbonate. În acest mod, colesterolul inhibă tranzițiile de fază induse de temperatură și împiedică diminuarea brutală a fluidității în cazul unei temperaturi scăzute (fig. 15).

În realitate implicațiile comportamentului moleculei de colesterol în membrană sînt mult mai ample (78). Ne rezumăm doar la o enumerare a acestora: efecte asupra ordinii moleculelor lipidice, asupra permeabilității, efectul de condensare a unor fosfolipide, efecte asupra capetelor lipidice și a regiunii carbonil (prezentate anterior), acțiune asupra difuziunii laterale și, în fine, asupra morfologiei membranei. La acestea se adaugă o serie de consecințe specifice tipului celular considerat. De exemplu, scăderea sau creșterea colesterolului din membrană deprimă funcția citotoxică a limfocitului (64).

Fluiditatea stratului bilipidic reprezintă determinantul major al fluidității globale a membranei, care se dovedește o proprietate cu implicații largi

Scanned with OKEN Scanner

în fiziologie și patologie (a se vedea subcap. 4). O serie de bacterii, levuri și alte heteroterme își reglează compoziția în acizii grași de la nivelul plasmalemei, funcție de temperatura mediului, în scopul menținerii unei fluidități relativ constante. Se ilustrează astfel importanța biologică a acestei proprietăți. A fost evidențiată o adaptare homeoviscoasă, exprimată prin modificări ale compoziției lipidice, la animalele care hibernează.

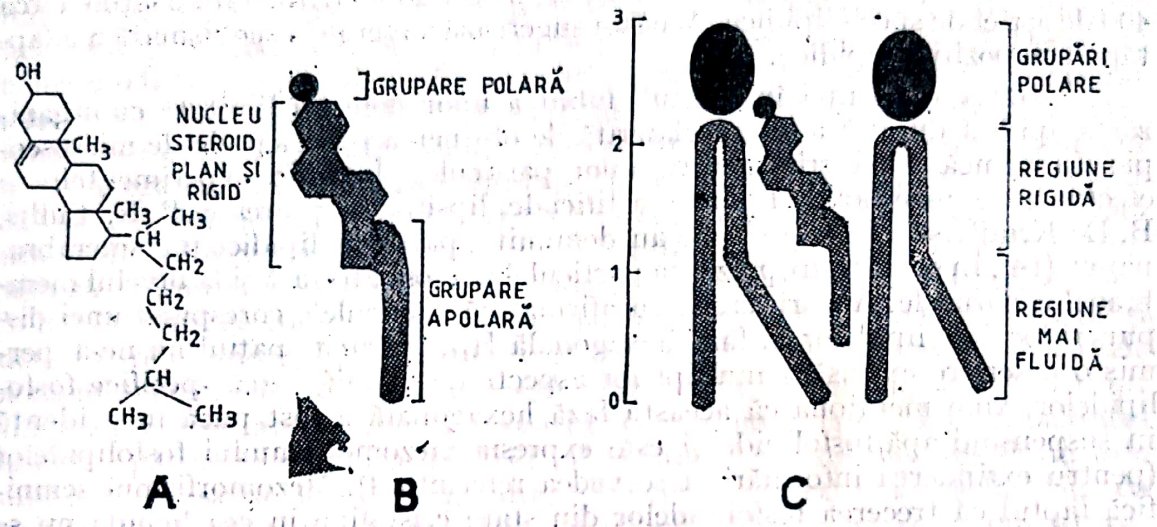


Fig. III. 15 — Colesterolul figurat prin formula sa chimică (A) și un desen schematic al moleculei, cu menționarea zonelor polară și apolară. În C este reprezentată interacțiunea colesterolului cu două molecule de fosfolipide, într-un strat monolipidic al membranei (După B. Alberts, 1986, modificat) (1).

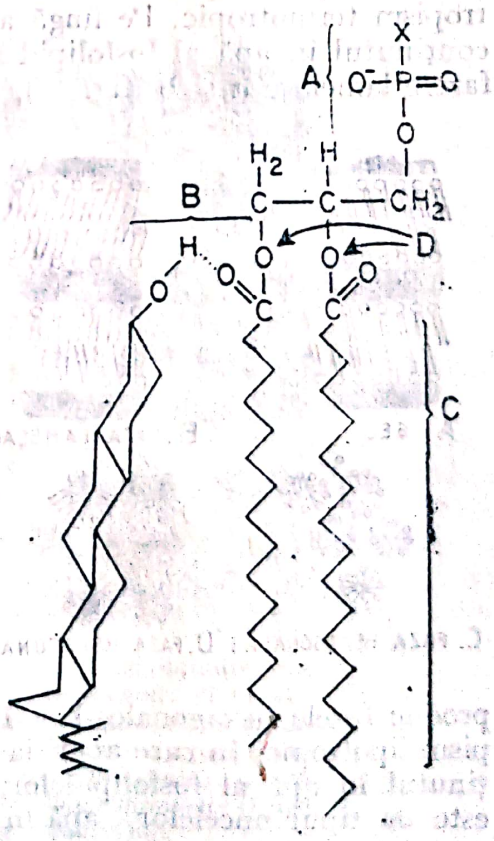


Fig. III. 16— Cîteva modificări ale fosfolipidelor produse cînd membrana este supusă unui stres experimental: A) înlocuirea sau modificarea capetelor polare; B) alterarea raportului colesterol/fosfolipide; C) creșterea conținutului în acizi grași nesaturați; D) rearanjarea porechilor de acizi grași în fosfolipide.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.3. *Existența microdomeniilor lipidice*

Perfecționările de ordin experimental, care permit accesul la subtilitățile organizării stratului bilipidic, au condus la susținerea existenței în cadrul acestuia a unor microdomenii cu caracteristici particulare. Ideea este logică, dacă se ia în considerare existența la nivelul aceleiași membrane a cîteva sute de specii lipidice. De exemplu, membrana eritrocitară conține circa 400 de astfel de specii lipidice. Aceasta sugerează anvergura neobișnuită a adaptării compoziției lipidice.

Ipoteza existenței în stratul dublu a unor domenii limitate cu organizarea lipidică diferită a fost declanșată de obținerea pe imaginile de microscopie electronică după criofractura unor particule. Întrucît experimentele se efectuau pe membrane lipidice artificiale lipsite de proteine, P. R. Cullis, B. De Kruijff și colab. (1979) le-au denumit „particule lipidice intramembranare" (14). În scurt timp, prezența particulelor a fost atestată și la nivelul membranelor naturale. Autorii citați au afirmat că particulele corespund unei dispuneri locale a lipidelor în faza hexagonală H_{II}. Întrucît spațiul nu ne-a permis o descriere extinsă a multiplelor aspecte de chimie fizică specifice fosfolipidelor, vom menționa că această fază hexagonală a fost pusă în evidență în suspensiile apă/fosfolipide și este expresia mezomorfismului fosfolipidelor (pentru extinderea informării a se vedea referința 4). Mezomorfismul semnifică faptul că trecerea fosfolipidelor din stare cristalină în cea lichidă nu se face direct, ci prin intermediul unor stări mezomorfe, de cristal lichid sau de lichid anizotrop, cu proprietăți intermediare între lichide și solide. Faza hexagonală II, menționată anterior, reprezintă una din stările mezomorfe. Mezomorfismul poate apărea la încălzirea fosfolipidelor, denumit în acest caz mezotropism termotropic. Pe lîngă aceasta, stările mezomorfe apar și funcție de conținutul în apă al fosfolipidelor. Astfel, la concentrații mari de apă apar fazele lamelare a și b (fig. 17), iar cînd concentrația de fosfolipide crește se

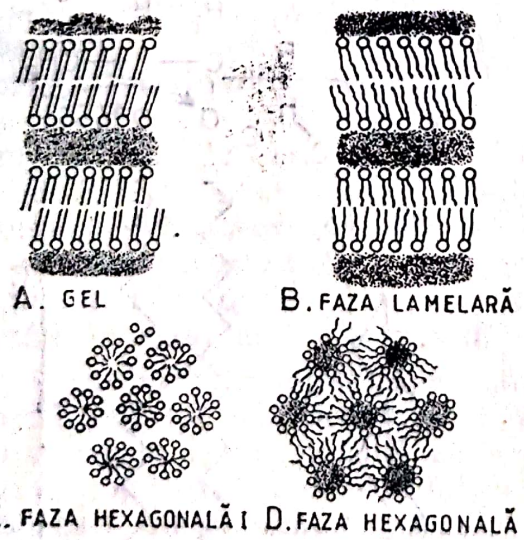


Fig. III. 17 — Reprezentarea schematică a structurii principalelor mezofaze pe care le prezintă fosfolipidele, ca o expresie a mezotropismului lipotropic.

produc fazele hexagonale I și II. Această proprietate se numește mezotropism lipotropic, în care apariția diferitelor faze este obținută atît de conținutul în apă al fosfolipidelor, cît și de temperatură. Faza hexagonală II este de tipul micelelor „apă în ulei", conținînd cilindri apoși înconjurați de

Scanned with OKEN Scanner

fosfolipide cu grupările polare orientate către faza apoasă și cu lanțuri de acizi grași la exterior (4).

Revenind la „particulele lipidice intramembranare", s-a demonstrat că la organizarea fazei H_{II} participă fosfatidiletanolamină, digliceridele și îndeosebi cardiolipina (15, 20). Prin extinderea cercetărilor la membranele naturale, din datele obținute au fost elaborate noi ipoteze cu privire la transportul facilitat al Ca^{2+} ca și la inserția proteinelor în stratul dublu lipidic. Este considerată certă participarea fazelor H_{II} în fuziunea membranei (62, 63). Deoarece incluziuni lipidice de tipul fazei H_{II} au fost puse în evidență la nivelul membranelor mai multor tipuri celulare s-a încercat explicarea semnificației lor funcționale. S-a conturat, astfel, ideea existenței domeniilor funcționale, exprimată prin segregarea componentelor lipidice ale membranei în domenii distincte (32, 40, 54). Metoda de elecție în detecția domeniilor lipidice rămîne criofractura, care, prin variantele recente ce asociază procedee de marcare citochimică, permite o explorare minuțioasă a microdomeniilor lipidice (54). Pe lîngă faptul că rolul acestor microdomenii nu este clar precizat, există și lucrări care consideră „particulele lipidice" doar simple deformări conice ale biomembranelor (70). Răspunzînd acestor rezerve, A. J. Verkleij și B. De Kruijff aduc mai multe argumente în favoarea coexistenței fazei H_{II} în bistratul lipidic: „particulele lipidice au fost observate și pe sisteme unde nu este implicată atașarea între membrane; asocierea directă a fazelor H_{II} cu particulele; dimensiunea particulelor mai mică decît în cazul curbaturii; datele RMN (70) (fig. 18). În prezent, se observă o extindere a existenței domeniilor funcționale la toate componentele suprafeței celulare, care pentru lipide pot exista chiar într-o diversitate mai mare decît faza H_{II} (19, 40, 54).

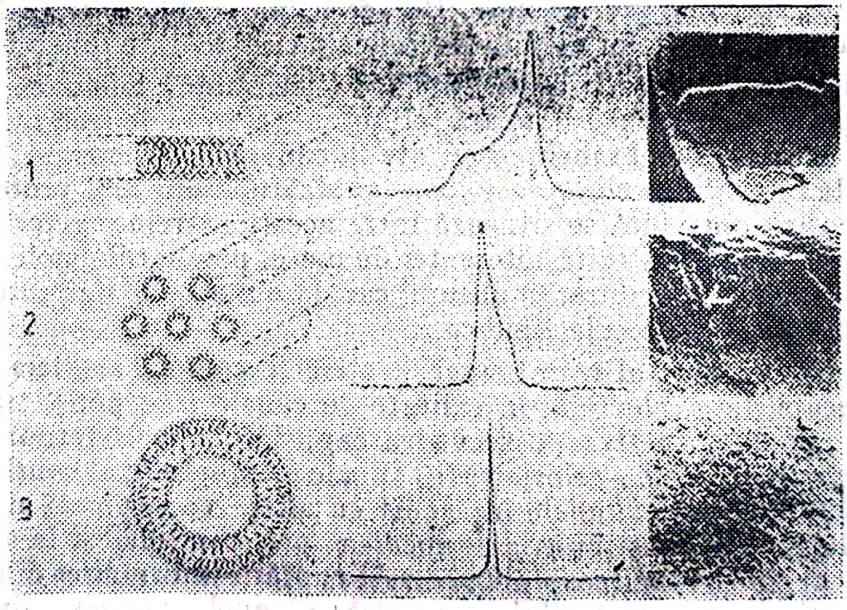


Fig. III. 18 — Spectrele RMN pentru 31P și imaginile obținute prin microscopie electronică după criofractură corespunzînd: 1) fosfolipidelor dispuse în strat dublu; 2) fosfolipidelor organizate în structuri hexagonale; 3) lipozomilor de dimensiuni mici obținuți prin ultrasonarea unei suspensii fosfolipidice. RMN permite discriminarea netă a organizării fazelor lipidice, inclusiv la nivelul biomembranelor (După A. J. Verkleij și B. de Kruijff, 1980) (70).

Scanned with OKEN Scanner

1.2.4. *Asimetria stratului bilipidic*

Pe un număr mare de membrane, atît la procariote cît și la eucariote, a fost constată o compoziție lipidică sensibil diferită a celor două monostraturi lipidice, (28, 60). Asimetria vizează toate tipurile de lipide, dar în mod particular o serie de fosfolipide. Deoarece mișcarea de basculare a moleculelor lipidice se produce foarte lent, devine probabil ca asimetria să fie produsă în cursul biosintezei stratului dublu lipidic în reticulul endoplasmic, prin enzime care realizează un transfer specific al moleculelor de lipide dintr-un monostrat în altul.

Semnificația asimetriei lipidelor nu este deocamdată clară. Se încearcă în primul rînd o corelație cu repartiția extrem de asimetrică a proteinelor membranare. S-a subliniat, de asemenea, adaptarea fiecărui tip de membrană la funcția organitului căruia trebuie să-i asigure contenția. Cea mai pronunțată asimetrie implică glicolipidele, localizate exclusiv la nivelul jumătății externe a stratului dublu lipidic. Această situare „strategică" la suprafața celulei ar putea juca un rol, deocamdată neclar, în comunicarea intercelulară.

Din datele prezentate rezultă că imaginea despre stratul bilipidic al membranei, considerat multă vreme o barieră relativ inertă, a suferit reconsiderări substanțiale.

2. PROTEINELE DE LA NIVELUL MEMBRANEI

Dacă lipidele formează matricea membranei, proteinele asigură aproape toate funcțiile specifice ale acesteia. De aceea, proporția și tipurile de proteine de la nivelul diferitelor membrane reflectă cu fidelitate funcțiile acestora.

Cazurile extreme pot fi reprezentate de membrana mielinică, conținînd din totalul masei membranei, datorită rolului mai simplu de izolant, doar 25% proteine, în timp ce membranele implicate în conversia de energie (membrana mitocondrială internă și a cloroplastelor) sînt alcătuite din 75% proteine. Membrana plasmatică obișnuită se situează între aceste extreme, avînd 50% proteine din masa totală. Datorită diferenței de mase, populațiile moleculare lipidice sînt totdeauna majoritare, în ultimul caz, la o moleculă de proteine corespunzînd circa 50 de molecule lipidice.

Component major al membranei, proteinele conferă acesteia în primul rînd o permeabilitate selectivă, în calitate de canale (sau pori), transportori specifici și „pompe" active (a se vedea cap. IV). Ele determină, de asemenea, cea mai mare parte a celorlalte funcții ale membranei: a) conțin determinanții specifici ai celulelor, unele în raport cu altele, ca și pe cei ai recunoașterii intercelulare; b) contribuie la inducerea formei celulei și la arhitectura membranei; c) constituie receptori necesari captării informației din mediu și transmiterii sale într-o zonă celulară precisă; d) unele proteine sînt enzime cu o localizare precisă (5, 74, 76).

Proteinele sînt mult mai puțin cunoscute decît lipidele membranare, aceasta atît din cauza unor obstacole metodologice, cît și datorită complexității structurale și funcționale a fiecărei proteine. Există o importantă excepție: proteinele de la nivelul membranei eritrocitare (a se vedea cap. VII).

Scanned with OKEN Scanner

Cu mare probabilitate proteinele membranare au un rol funcțional preponderent, doar o mică parte jucînd un rol pur structural. Totuși, implicarea structurală a proteinelor devine indispensabilă în cadrul relațiilor cu citoscheletul (a se vedea cap. VI) ca și la nivelul joncțiunilor intercelulare (a se vedea cap. V).

2.1. Tipuri de proteine membranare

Cea mai clară distincție, cel puțin pentru moment, a tipurilor de proteine la nivelul membranei este sugerată de raporturile acestora cu dublul strat lipidic. Se acceptă existența a două căi de interacțiune a proteinelor cu matricea lipidică: ele pot fi asociate cu capetele polare ale lipidelor sau cu regiunea nepolară a stratului dublu. Această supoziție este susținută de existența a două clase generale de proteine (58) (fig. 19). Prima clasă constă din

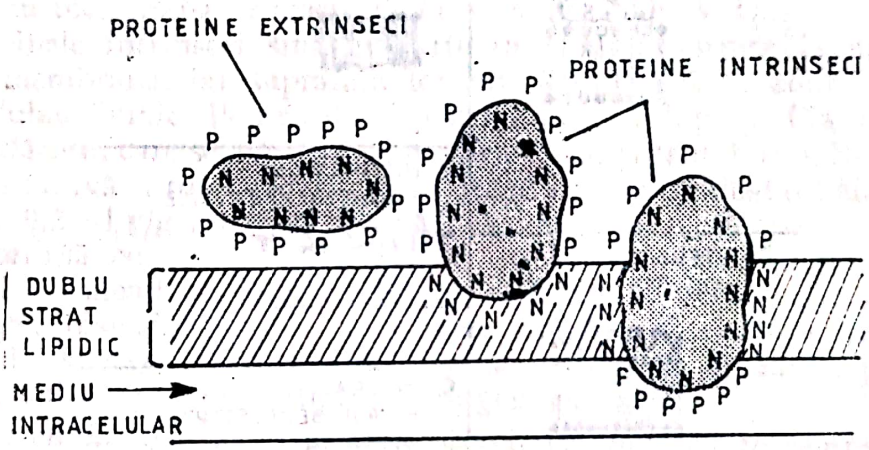


Fig. III. 19 — Localizarea în membrană a proteinelor intrinseci și extrinseci. Este reprezentată distribuția aminoacizilor polari (P) și nepolari (N) pentru cele două tipuri de proteine.

proteine care pot fi deplasate din membrane prin metode „blînde" cu solvenții hipotoni, soluțiile saline puternice, sau cationii divalenți. Aceste proteine au fost denumite extrinseci sau periferice membranei. Explicația cea mai simplă a îndepărtării lor ușoare din membrană constă în asocierea cu capetele polare ale lipidelor (27). A doua clasă cuprinde proteinele care nu pot fi extrase din membrană decît prin detergenți. Aceste proteine au fost denumite *intrinseci sau integrale*. Deoarece structura detergenților utilizați se aseamănă cu a lipidelor membranare, în sensul că aceștia sînt de asemenea amfifili, se presupune că partea nepolară a detergentului înlocuiește regiunile nepolare ale lipidelor din asocierea lor cu proteinele membranare (12). Se acceptă, deci, că proteinele intrinseci sînt asociate în principal cu regiunile nepolare ale stratului dublu lipidic. Pentru simplificare, fiecare proteină a fost inclusă în una din cele două clase, dar în realitate există proteine membranare care au parțial proprietăți intrinseci și deopotrivă extrinseci (27).

Proteinele membranare mai pot fi distinse și funcție de compoziția chimică, respectiv, conținutul lor în glucide. Pe această bază ele au fost clasifi-

cate în proteine negliconjugate și glicoproteine (fig. 20). Reziduurile glucidice ale glicoproteinelor sînt expuse exclusiv la nivelul feței externe a membranelor (44). Dispoziția asimetrică a părții hidrocarbonate reflectă anizotropia funcțională a celor două suprafețe ale membranei. Totuși, clasificarea funcție de condițiile extracției din membrană este deocamdată cea mai logică, deoarece oferă (cu toate dificultățile identificării îndeosebi a proteinelor extrinseci) sugestii asupra naturii legăturilor proteinelor cu stratul dublu lipidic. Totodată ea este doar pragmatică și nu trebuie confundată cu o descriere moleculară a modului de asociere a acestor proteine cu dublul strat, deocamdată necunoscută (74, 75).

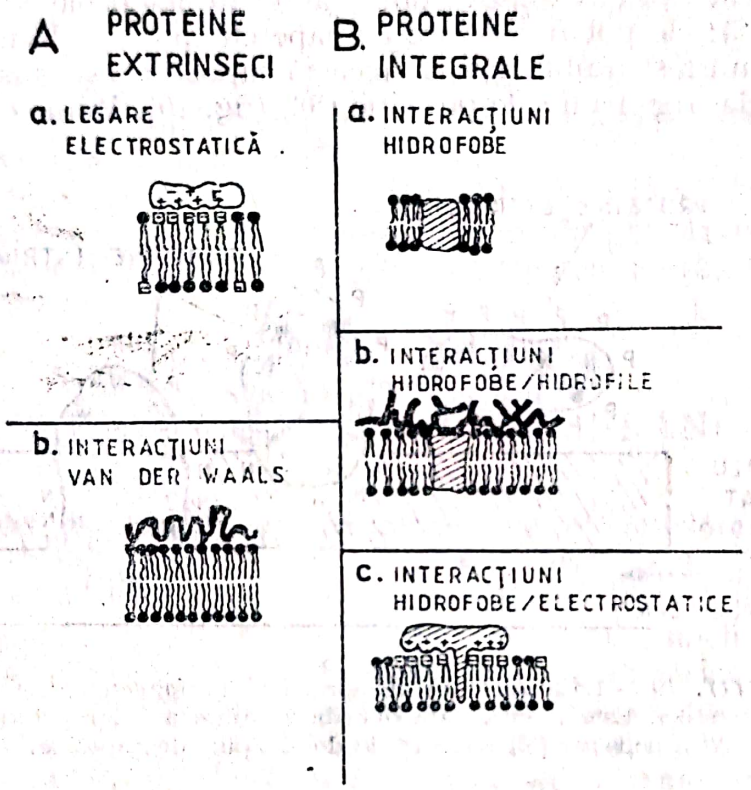


Fig. III. 20 — Tipuri de interacțiuni lipide/proteine posibile la nivelul membranei: A) mecanisme de legare pentru proteinele extrinseci; B) mecanisme caracteristice proteinelor integrale.

2.2. Proteinele extrinseci sau periferice

Ca urmare a existenței celor două fețe ale biomembranei, se acceptă existența a două tipuri de proteine extrinseci: unele prezente la nivelul suprafeței externe a membranei și altele localizate la nivelul feței citoplasmatice. Se cunosc puține proteine extrinseci din prima categorie, probabil datorită îndepărtării lor consecutive procedeelor de izolare a biomembranelor. O probă în favoarea prezenței unor proteine extrinseci pe fața externă a membranei ar putea fi constituită de modul în care funcționează receptorii de la nivelul plasmalemei. Se știe că la nivelul acestora se leagă specific diferite molecule, inclusiv de natură proteică (hormoni, anticorpi, lectine), devenind astfel episodic proteine extrinseci ale membranei (55).

Scanned with OKEN Scanner

O serie de proteine ca enzimele sau antigenele sînt probabil ancorate la suprafața membranei în scopul localizării acțiunilor specifice. Evident, enzimele sînt asociate membranei la nivelul ambelor fețe, în raport cu funcția specifică, pe cînd antigenele sînt dispuse exclusiv pe fața externă.

Existența proteinelor extrinseci de la nivelul feței citoplasmatice a membranei este definitiv demonstrată în cazul scheletului membranei eritrocitare (a se vedea cap. VII).

Mai multe lucrări recente semnalează prezența și în alte celule a unor proteine asemănătoare cu spectrina, sindeina și banda 4.1 eritrocitare (35, 43). De aici concluzia unei similitudini a citoscheletului la nivelul tuturor celulelor (a se vedea cap. VI).

2.3. Proteinele intrinseci

Datele asupra proteinelor intrinseci sînt mai consistente, dar tot puține în raport cu membrana eritrocitară (a se vedea cap. VII).

Proteinele intrinseci sînt în parte incluse, incastrate la nivelul lipidelor din membrană, iar suprafața lor interacționează cu zona nepolară a stratului dublu lipidic. Pentru demonstrarea acestui fapt J. Clarke a elaborat o metodă prin care se măsoară cantitatea de detergent Triton X-100 legată la proteina nativă. Proteinele intrinseci leagă cantități substanțiale de detergent, între 0,2—1 g/g proteină și în felul acesta pot fi identificate (12). Metoda se sprijină pe faptul că detergenții, molecule mici amfifile, cînd sînt amestecați cu membranele se leagă pe regiunile hidrofobe ale proteinelor membranare, dislocîndu-se de moleculele lipidice. Cealaltă extremitate a moleculei de detergent fiind polară, fixarea conduce la extracția proteinelor în soluție, sub formă de complex detergent-proteină.

După eliminarea detergentului, proteinele solubilizate temporar devin de obicei foarte insolubile și precipită în mediu apos, sub forma unui amestec de specii diferite. Proteinele membranare sînt, deci, mult mai dificil de purificat și de studiat decît proteinele hidrosolubile. În plus, în timpul extracției ele pot fi denaturate, prin alterarea structurii conformaționale. Totuși, în condițiile utilizării de detergenți slabi, în concentrație redusă se poate reuși o prezervare a proteinelor în forma nativă (26).

În prezent, prin combinarea acțiunii detergenților cu separarea prin electroforeză s-a realizat un avans metodologic excepțional. Cea mai productivă tehnică este electroforeza în gel de poliacrilamidă în prezența detergentului dodecilsulfat de sodiu (SDS). În acest scop, membranele sînt mai întîi încălzite la 100°C într-o soluție de SDS 1%. Detergentul, fiind puternic, rupe toate interacțiunile noncovalente dintre proteine, sau dintre proteine și lipide. Apoi se efectuează, timp de mai multe ore, electroforeza în gel de poliacrilamidă conținînd SDS. Rolul SDS anionic constă în neutralizarea sarcinilor negative ale proteinelor. Ca urmare, proteinele vor migra exclusiv funcție de masa proprie; cu cît o proteină este mai voluminoasă, cu atît migrarea sa va fi mai lentă datorită obstrucției create de rețeaua de poliacrilamidă. Mai recent, prin tehnici bidimensionale s-a reușit separarea și identificarea unui număr și mai crescut de proteine. Se pot separa, astfel, dintr-un singur tip de membrană plasmatică peste 50 de proteine (1). În plus, există numeroase specii de proteine aflate în cantități foarte mici, încă nedetec-

Scanned with OKEN Scanner

tate, după cum o serie de membrane, specializate sau cu funcții restrînse, conțin doar 1—3 proteine majore. De exemplu, rodopsina reprezintă singura proteină majoră din segmentul extern al bastonașelor retiniene, mielina conține 3 proteine majore, reticulul sarcoplasmic 2—3 asemenea proteine (27).

2.3.1. *Tipuri de proteine intrinseci*

Se pot distinge două tipuri de proteine intrinseci, pornind de la deosebirile substanțiale ale proprietăților și dispunerea de la nivelul membranei. Acestea sînt tipurile de proteine I și II (fig. 21).

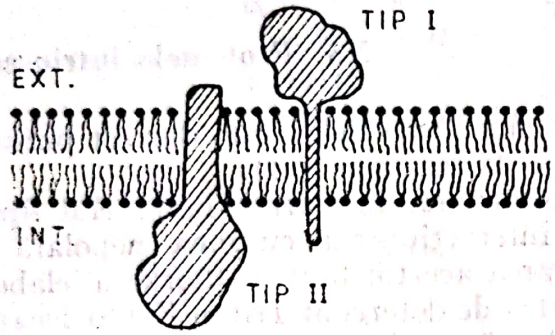


Fig. III. 21 — Dispunerea în membrană a celor două tipuri de proteine intrinseci (După G. Guidotti, 1986) (27).

Proteinele intrinseci de tipul I prezintă cea mai mare parte a masei în mediul apos de la nivelul feței necitoplasmatice a membranei, unde își exprimă proprietățile funcționale. Porțiunea intramembranară a proteinei servește doar la ancorarea în stratul dublu lipidic. Ea are formă de bastonaș constînd dintr-un lanț strîns cu înfășurare de tip alfa helix (7). Glicoforina eritrocitară este cea mai cunoscută proteină din acest grup (a se vedea cap. VII). În prezent se cunosc numeroase proteine membranare legate la suprafața celulei printr-o simplă elice alfa hidrofobă și ancorate în citoplasmă printr-o coadă hidrofilă. Frecvent, au rol de receptori specifici ai moleculelor extracelulare sau sînt antigene de histocompatibilitate. Structura unor receptori este în prezent foarte bine cunoscută, pînă la nivel de lanț polipeptidic primar și organizare conformațională (a se vedea cap. V).

Majoritatea proteinelor de tipul I prezintă gruparea NH_2-terminală la exterior, iar COOH-terminal este situat în citoplasmă. Dimpotrivă, unele proteine, ca izomaltazsucraza intestinală și neuraminidaza virusului gripal sînt ancorate invers.

Proteinele intrinseci de tip II prezintă două caracteristici majore: a) cea mai mare parte din masa lor se află situată în citoplasmă și numai o fracțiune foarte redusă din resturile de aminoacizi este expusă la nivelul feței externe a stratului bilipidic; b) mecanismul de inserție în stratul dublu este diferit.

Acumularea rapidă a datelor începe să „complice" distingerea celor două tipuri de proteine. Astfel, în cadrul tipului II, se conturează mai multe grupe de proteine. Un prim grup cuprinde citocromul b_5, reductaza citocromului b_5 și stearil-Co-A-reductaza. Proteinele grupului au o caracteristică similară cu cele de tipul I, în sensul că prezintă domeniile lor funcționale situate în întregime în compartimentul apos. În ceea ce privește, însă, atașarea la membrană, ea este mai amplă decît în cazul tipului I. Astfel, cito-

Scanned with OKEN Scanner

cromul b_5 este atașat la membrană prin intermediul zonei hidrofobe a moleculei care prezintă terminal grupul COOH și conține 44 de aminoacizi. Porțiunea intramembranară a polipeptidului conține două aranjamente, unul prin care se traversează stratul dublu în întregime, iar al doilea localizat numai la nivelul stratului monolipidic intern (16, 45, 62).

O altă grupă distinctă în cadrul proteinelor de tip II cuprinde proteinele implicate în procesele transmembranare, cum ar fi fenomenele de transport. Deocamdată, deși grupa pare mult mai amplă, sînt caracterizate bine doar cîteva proteine: (Na, K)-ATP-aza, (Ca)-ATP-aza, banda 3 din membrana eritrocitului uman, rodopsina vertebratelor și bacteriorodopsina. Ultima este cea mai bine cunoscută și reprezintă singurul tip de moleculă proteică din membrana bacteriei *Halobacterium halobium*. Bacteriodopsina conține în lanțul primar 248 aminoacizi, iar fiecare moleculă conține o grupare prostetică unică, cu rol de fotoreceptor sau cromofor, identic cu cromoforul rodopsinei din bastonașele retiniene ale vertebratelor (fig. 22). Studiul bacte-

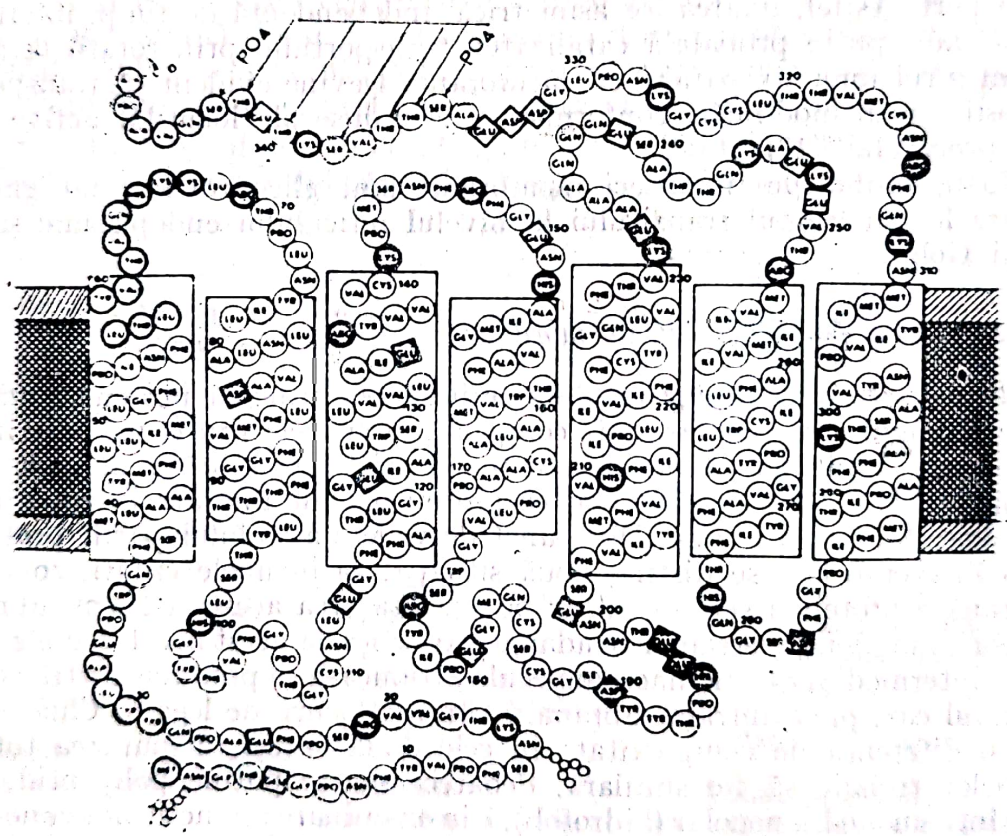


Fig. III. 22 — Structura și dispunerea la nivelul stratului bilipidic a rodopsinei de bou (După G. Guidotti, 1986) (27).

riodopsinei a fost favorizat de proprietatea sa de a forma domenii cristaline hexagonale în membrană, alcătuite din zeci de mii de molecule proteice și din sute de mii de molecule lipidice. Ca urmare, a fost posibilă reconstituirea structurii sale tridimensionale de la nivelul membranei pînă la o rezoluție de 0,7 nm. Cercetările au arătat că fiecare moleculă de bacteriorodopsină este repliată în 7 elice α înguste și strînse, fiecare alcătuite din cîte circa 30 de

Scanned with OKEN Scanner

aminoacizi. Cele șapte „bastonașe" constituite de elice traversează stratul dublu lipidic aproape în unghi drept (65, 73).

Din datele existente rezultă o caracteristică a tuturor proteinelor din această grupă: stratul dublu lipidic este traversat de segmente multiple ale polipeptidului, aflate în conformație α helix, iar în spațiul extracitoplasmatic se află o parte relativ redusă a proteinei comparativ cu părțile conținute în membrană și în citoplasmă.

În fine, există și proteine care îmbină ambele caracteristici ale tipurilor I și II. Un exemplu în acest sens îl reprezintă receptorul nicotinic al acetilcolinei, compus din 5 subunități, dintre care două α și cîte una β, γ și δ. Receptorul prezintă 4 segmente transmembranare ($\alpha_2\beta\gamma\delta$), cu zone largi ale fiecărui polipeptid pe ambele fețe ale membranei. Este posibil să rezulte astfel două funcții: a) transport de ioni, datorat dispunerii de tip II; b) acțiune ca receptor la nivelul joncțiunii neuromusculare, prin dispunerea de tip I (27).

În cazul acestor proteine intrinseci, organizarea structurală de la nivelul membranei sugerează tot mai clar mecanismele moleculare ale proteinelor de transport. Astfel, fixarea lor asimetrică, independentă de timp, în stratul bilipidic, face puțin probabilă catalizarea transportului prin rotații la acest nivel, în jurul unui ax paralel cu membrana. Devine evident că transportul este posibil prin modificări conformaționale reduse ale locurilor active destinate procesului (27).

Toate proteinele intrinseci membranei sînt glicoproteine, iar glicozilarea are loc în timpul tranzitului la nivelul reticulului endoplasmic și sistemului Golgi.

2.3.2. *Structura porțiunii intramembranare*

Primele studii tridimensionale permit să se afirme că proteinele adoptă la nivelul membranei conformații comparabile cu cele din cazul proteinelor hidrosolubile, mult mai bine cunoscute datorită posibilității de izolare în stare nativă. Este de asemenea clar că proteinele sînt inserate în zona nepolară a stratului dublu lipidic. Din punct de vedere al rolului părții proteinei situată în membrană se disting două situații: a) în unele cazuri, zona din membrană a proteinei servește doar pentru atașarea acesteia la membrană; b) alteori, funcției de atașare i se adaugă existența la acest nivel a unor regiuni prin intermediul cărora macromolecula acționează ca proteină de transport. În ultimul caz, piesa intramembranară conține locuri de legare. Chiar dacă există o diferență de complexitate în cele două cazuri, dispunerea tuturor proteinelor trebuie să fie similară, deoarece foarte puține polipeptide sînt stabile într-un mediu nepolar (hidrofob). Din examinarea structurilor cunoscute pînă în prezent rezultă că toate proteinele intrinseci prezintă două domenii: unul exterior dublului strat lipidic și altul în interiorul acestuia. Porțiunea situată în membrană trebuie să fie elicoidală din următoarele rațiuni: a) pentru proteinele cu funcții de transport dispunerea de tip α-helix este mai simplă și mai economică decît cea de tip β pliat; cînd lanțul polipeptidic este mai lung se formează două sau mai multe structuri elicoidale care pot coexista cu conformația de tip pliat, dar primele sînt majoritare; b) pentru proteinele cu funcții de transport, structurile α-helix asigură formarea unor locuri active hidrofile care nu sînt în contact cu zona hidrofobă a stratului bilipidic; aceasta deoarece complexele α-helix pot fi stabilizate prin două tipuri de interacțiuni:

Scanned with OKEN Scanner

polare, prin contactele helix-helix și nepolare, care stabilizează complexele helix în regiunea nepolară a stratului dublu lipidic. Evident, o asemenea dispunere implică existența unor secvențe de aminoacizi strict specifice. Ipotetic, prin alternanța polară-nonpolară a aminoacizilor se explică existența celor două zone, polară și nepolară, adică hidrofilă și hidrofobă a lanțurilor α-helix asociate. Devine astfel plauzibilă formarea unor canale polare care străbat stratul bilipidic, alcătuite din asocierea mai multor structuri elicoidale. Existența structurilor de tip α-helix la nivelul porțiunii intramembranare este susținută și de calculul energiei libere rezultată din interacțiunea acestor structuri cu regiunea nepolară a stratului dublu lipidic (27).

2.4. *Mecanisme de inserție și topografie*

Dispunerea specifică a celor două tipuri de proteine sugerează mecanisme de inserție diferite. Astfel, tipul I, cu masa majoritară în compartimentul extracelular, apare ca fiind constituit din proteine secretate, ulterior reținute parțial în membrană. În acord cu această aserțiune, proteinele de tipul I sînt sintetizate avînd o secvență NH_2-terminală care guvernează translocarea părții majoritare a masei proteinei în afara citoplasmei (34).

Situația este diferită în cazul tipului II de proteine, localizate exclusiv în citoplasmă și la nivelul stratului bilipidic, unde prezintă de regulă mai

TABEL V

Proteine membranare care traversează stratul dublu lipidic
(Date din literatură reunite de G. Warren, 1981) (75)

Proteina	Sursă	Metodă
Proteine cu o singură traversare		
Glicoforina	Eritrocitul uman	Marcare chimică
Proteine ale spiculilor virali	Virusul SF	1) Marcare chimică
	Virusul Sindbis	2) Tratament cu protează
Proteine de înveliș	Fagul filamentos M_{13}	Anticorpi
Aminopeptidază	Celulele intestinale în perie (porc)	Marcare chimică
Antigene de histocompatibilitate de la om (HLA)	Limfocite	Marcare chimică
Proteina G	Stomatita veziculară virală	Tratament cu proteaze
Antigene de histocompatibilitate șoarece (H—2)	Limfom șoarece SL_2	Tratament cu proteaze
Proteine cu mai multe traversări		
Banda 3 eritrocitară	Eritrocit uman	Marcare chimică
(Na, K)— ATP-aza	Rinichi-cîine	Anticorpi
Bacteriorodopsina	Halobacterium halobium	Difracție cu raze X
Proteine de schimb ATP/ADP	Mitocondrii de bou	Anticorpi
Receptor acetilcolină	Torpedo	Anticorpi
Rodopsină	Bastonașe retiniene	Marcare chimică

Scanned with OKEN Scanner

multe lanțuri (fig. 23). Aceste proteine pot fi considerate ca fiind alcătuite din bucle multiple polipeptidice care străbat dublul strat lipidic de la citoplasmă spre suprafața extracelulară și înapoi. Proporția fiecărei bucle la nivelul citoplasmei poate varia. Se presupune că porțiunea inițială a fiecărei bucle are funcție de secvență semnal, în timp ce porțiunea următoare conține

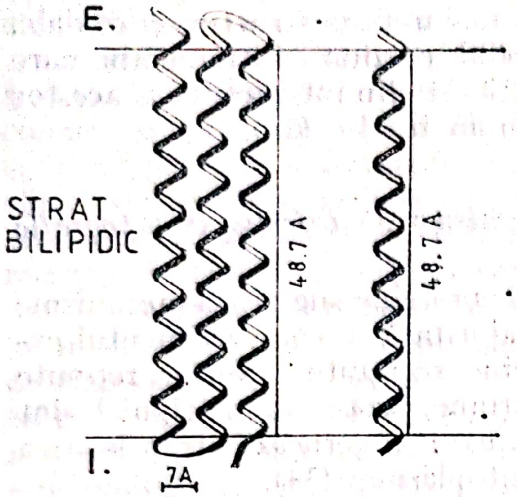


Fig. III. 23 — Dispunerea sub forma unui α-helix unic (proteine de tipul I) și a unor lanțuri multiple de tip α-helix (proteine de tipul II) în stratul dublu lipidic. Imaginea reprezintă o secțiune perpendiculară prin membrană. Pentru străbaterea o singură dată a dublului strat lipidic sînt necesare 9 răsuciri (spire) ale elicei (32—33 resturi de aminoacizi) sau 35000 daltoni din lanțul polipeptidului. (După G. Guidotti, 1986) (27).

o altă secvență de atașare la stratul bilipidic. Rezultă că inserția fiecărei bucle în zona lipidică apolară impune participarea unor componente implicate în translocarea proteinelor: particule semnal de recunoaștere și o serie de proteine cu acest rol (27, 73).

Stabilirea topografiei reale a proteinelor la nivelul membranelor reprezintă o dificultate majoră. Tehnicile denumite de marcaj vectorial permit determinarea „polarității" unei proteine în raport cu fețele membranei. În principiu, există două moduri prin care se poate preciza localizarea unei proteine: a) marcarea cu un reactiv covalent, frecvent radioactiv sau fluorescent, care nu penetrează și se fixează pe grupări specifice exclusiv pe fața expusă a membranei; proteinele sînt ulterior separate și detectate datorită radioactivității lor sau, respectiv, fluorescenței pe care o prezintă; b) expunerea feței externe sau citoplasmatice a membranei la acțiunea unor enzime proteolitice care nu pătrund în membrană; dacă proteina este digerată parțial la nivelul ambelor fețe, cu mare probabilitate ea traversează membrana, fiind deci intrinsecă.

O probă directă asupra localizării proteinelor la nivelul biomembranelor este criofractura (a se vedea cap. VII). După congelare, membrana este fracturată la nivelul unui plan ce are tendința să treacă la nivelul zonei hidrofobe a dublului strat lipidic, obținîndu-se astfel o separare a celor două foițe lipidice. La microscopul electronic se observă o serie de particule intramembranare, care în majoritatea cazurilor sînt expresia existenței proteinelor (fig. 24). Apartenența particulelor la o anumită proteină a constituit obiectul unor studii laborioase. Dezvoltările recente, prin care procedeul este asociat cu metode citochimice au permis, pe lîngă identificarea și localizarea unor proteine, studiul sterolilor și al fosfolipidelor (6, 42, 54, 71). O serie de rezultate au demonstrat existența unei dinamici a proteinelor în membrană, ca și afectarea distribuției unor proteine provocată de o serie de factori experimentali sau în cadrul unor stări patologice.

Scanned with OKEN Scanner

Probele cele mai edificatoare pentru obținerea unor date asupra stării reale a proteinelor la nivelul membranelor sînt produsul tehnicilor de reconstituire. Cel mai frecvent, după solubilizarea și purificarea cu detergenți, proteinele sînt încorporate în lipozomi. Este posibil să se încorporeze într-un lipozom, diferite proteine, fie pornind de la un amestec de mai multe complexe proteină-detergent, fie reconstituind o proteină secundă într-un proteolipozom care conține o primă proteină. Se recreează astfel interacțiuni

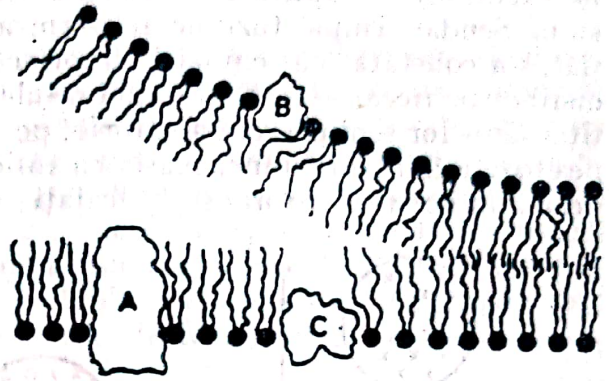


Fig. III. 24 — Schiță a separării celor două monostraturi lipidice prin criofractură. Sînt figurate 3 proteine (A, B, C). Dar numai proteina A va putea fi relevată după obținerea replicii, iar ulterior observată la microscopul electronic.

între diferite proteine, care pot să se dovedească indispensabile pentru apariția anumitor activități enzimatice. S-a reușit, de asemenea, reconstituirea asimetriei de distribuție a unor proteine. Dintre sistemele de interes particular, a căror reconstituire a fost realizată enumerăm: pompa de Ca^{2+}, receptorul nicotinic pentru acetilcolină, sistemele de transport pentru aminoacizi și bacteriorodopsina (30).

2.5. Mobilitatea proteinelor la nivelul membranei

Proteinele intrinseci ale membranei prezintă la nivelul stratului dublu lipidic două tipuri distincte de mobilitate: a) o difuziune rotațională rapidă în lungul axului proteinei, perpendicular pe planul stratului dublu; b) o difuziune laterală rapidă în interiorul aceluiași strat bilipidic. Rotația prin planul stratului dublu este un eveniment prohibit, care ar avea ca rezultat modificarea orientării relative a proteinei la nivelul membranei. După sinteză proteina rămîne încorporată într-o manieră bine definită în membrană. Poziția exactă a proteinei depinde de secvența sa în aminoacizi și de mecanismul său de încorporare, orientarea rămînînd aceeași pe toată durata de viață a acesteia. Dacă totuși se produc astfel de mișcări ele s-ar putea datora modificărilor de structură sau de inserție ale proteinei. Ca o modalitate particulară a mobilității proteinelor este inclusă și deplasarea laterală a complexelor ligand-receptor, urmată de agregarea acestora.

Difuziunea rotațională de tip brownian se desfășoară pe un plan perpendicular axului membranei și este în corelație cu fluiditatea lipidelor. A fost studiată în particular în cazul rodopsinei prin metoda dicroismului circular. Mișcarea de rotație poate fi măsurată direct, prin expunerea bastonașelor la un flash de lumină polarizată extrem de scurt (5 ms).

Difuziunea laterală este posibilă datorită fluidității dublului strat lipidic, rezultantă a diverselor mișcări lipidice. Prima demonstrație experimentală a difuziunii laterale a proteinelor, a devenit prin eleganța și claritatea

Scanned with OKEN Scanner

sa un exemplu tipic, prezent inclusiv în manualele didactice. Astfel, L. D. Frye și M. Edidin au pus în evidență (1970) fenomenul, consecutiv fuziunii celulelor provenind de la două specii diferite (om și șoarece) (24).

Autorii citați au marcat în prealabil cu anticorpii specifici proteinele sistemelor de histocompatibilitate H_2 (șoarece) și HLA (om) la nivelul membranelor celor două celule diferite. Anticorpii erau marcați cu cromofori care emiteau prin fluorescență lumină de lungimi de undă diferită (verde și roșu, de exemplu). Fuziunea celor două celule a fost efectuată prin acțiunea virusului Sendai. După fuziune se formează o nouă celulă (heterocarion). Inițial, s-a constatat că semnalele fluorescente de culori diferite erau repartizate distinct pe fiecare emisferă a noii celule. După circa 30—40 de minute repartiția ambelor semnale era aleatorie, pe toată suprafața celulei (fig. 25). Devenea foarte clară difuziunea masivă a anticorpilor, și, deci, a proteinelor de membrană împotriva cărora sînt dirijați acești anticorpi (24).

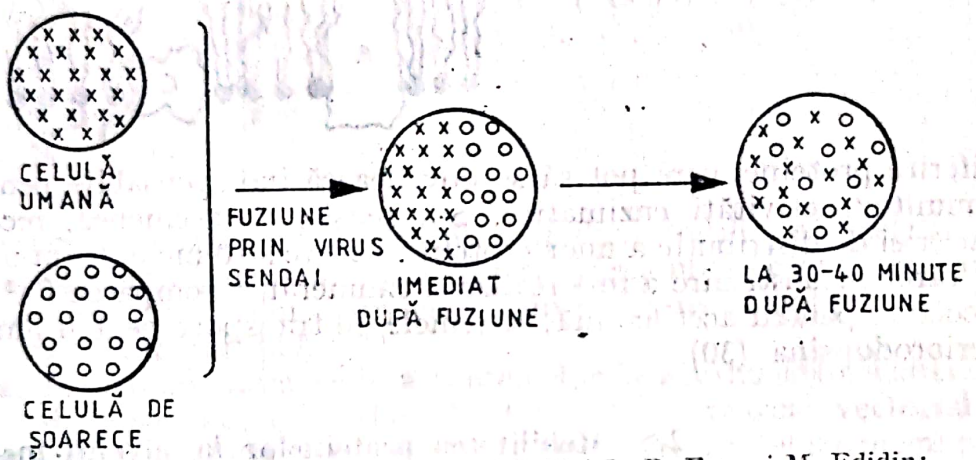


Fig. III. 25 — Schema experimentului lui L. D. Frye și M. Edidin: prima probă decisivă asupra mișcării proteinelor în planul membranei. Difuziunea proteinelor în membrană după fuziunea celulă umană-celulă de șoarece, indusă de virusul Sendai (24).

Ulterior, au fost elaborate metode de cuantificare a procesului, stabilindu-se astfel coeficienți de difuziune laterală (DL) pentru mai multe proteine integrale ale membranei. În cazul rodopsinei, de exemplu, D_L reprezintă $2—6 \times 10^{-9}$ cm$^2 \cdot$s^{-1}, pentru receptorii specifici ai insulinei și EGF avînd valoare de $3—5 \times 10^{-10}$ cm$^2 \cdot$s^{-1}, iar pentru imunoglobulinele suprafeței limfocitului 3×10^{-10}. Coeficientul de difuziune laterală scade dramatic în tranzițiile de fază ale lipidelor, producîndu-se o reunire a proteinelor în conglomerate. Imobilizarea completă se produce la trecerea lipidelor din faza cristal-lichid în faza solidă, evident sub influența temperaturii.

3. APA ȘI IONII DE LA NIVELUL BIOMEMBRANELOR

Nu există date analitice asupra conținutului diferitelor biomembrane în apă și ioni. Probabil în primul rînd din rațiuni de ordin metodologic, evidente în cazul apei. Totuși, atît apa, cît și unii ioni, pe lîngă tranzitul continuu prin mecanisme variate, fac parte și din compoziția stabilă, în echilibru dinamic, a biomembranelor.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul ionilor, indeosebi prin dezvoltarea metodelor de microanaliză nucleară, încep să apară o serie de rezultate certe. Cel mai important ion, care în afara transportului, rămîne de asemenea și ca un component constitutiv al biomembranelor este Ca^{2+}. Rolul său în menținerea structurii membranei este primordial. Utilizarea unui agent chelator, care smulge cationul de la nivelul locurilor de fixare intramembranare, antrenează o diminuare evidentă a coeziunii membranei, cu atît mai flagrantă cu cît rarefacția în Ca^{2+} este mai extinsă. Alți cationi legați de membrană atît structural cît și funcțional sînt Mg^{2+}, Na^{+} și K^{+}.

În ceea ce privește apa, rolul său într-o amplă serie de procese de membrană este incontestabil și în acest sens contribuții deosebite au fost aduse de V. Vasilescu și colab. (67, 68). Chiar biogeneza membranelor naturale este considerată consecința efectelor structurii apei asupra orientării moleculelor amfifile (53). Deocamdată, însă conversia către o tratare cantitativă riguroasă a multiplelor aspecte de ordin calitativ rămîne dificilă. Metodele fizice, îndeosebi RMN au permis începutul unei discriminări mai exacte a fracțiunilor de apă „legată". Modelul prin intermediul căruia s-ar acceda la o evaluare cantitativă precisă rămîne, probabil, cel elaborat de G. N. Ling (37, 38).

4. MODELUL MOZAICULUI FLUID AL BIOMEMBRANELOR

După anul 1960, acumularea explozivă de date a condus la un impas în reprezentarea globală, concretizată într-un model, a biomembranelor. În consecință, între 1960 și 1970 s-a produs o înmulțire exagerată a modelelor de membrane, nu totdeauna conforme cu datele experimentale (a se vedea cap. II). Era necesară o nouă reformulare, care, fără să ignore elementele valabile din modelele clasice Danielli-Davson și Robertson, să ofere un model nou conceptual și în același timp „rezistent" la noile descoperiri din domeniul structurii și funcției biomembranelor.

Imediat după 1972 se conturează un consens, consecutiv căruia, deși au fost implicați mai mulți cercetători (10, 36, 58, 72) S. J. Singer și G. L. Nicolson avansează, în anul 1972, conceptul ultrastructurii membranei întruchipat în „modelul mozaicului fluid" (59). Acest concept a dobîndit rapid acceptiunea marii majorități a cercetătorilor și, în linii esențiale, toate rezultatele obținute ulterior îl susțin. Modelul menține ca structură de bază stratul dublu lipidic, la nivelul căruia se află implîntate proteinele intrinseci, integrale ale membranei asemenea unor „aiseberguri" ce plutesc pe mare (fig. 26). Protei-

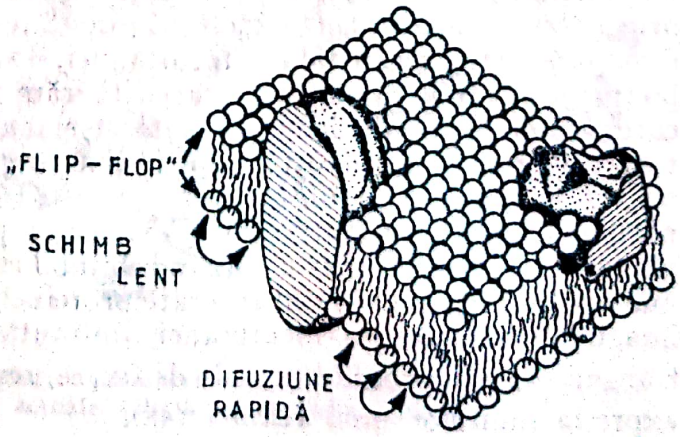


Fig. III. 26 — Reprezentarea schematică originală a modelului mozaicului fluid, al membranei, cu menționarea mișcărilor posibile ale moleculelor lipidice. (După S. J. Singer și G. L. Nicolson, 1972) (59).

nele integrale stabilesc în miezul stratului bilipidic interacțiuni hidrofobe cu părțile apolare ale lipidelor, respectiv cu lanțurile acizilor grași. Porțiunea hidrofilă a moleculelor proteice proemină în afara membranei, fiind în contact cu mediul apos și cu grupările polare ale fosfolipidelor. Lanțul polipeptidic al unei proteine poate traversa membrana o dată sau de mai multe ori; diferitele lanțuri polipeptidice pot fi asociate în sinul membranei în proteine oligomerice ori în complexe multienzimatice. Membrana este deci constituită *dintr-un mozaic* de regiuni în strat dublu lipidic și de regiuni conținînd proteine integrale. La acestea se adaugă proteinele periferice (sau extrinseci), dispuse de o parte și de alta a membranei și stabilind interacțiuni de tip electrostatic, fie cu părțile polare ale lipidelor, fie cu părțile polare expuse la suprafață ale proteinelor integrale. Noțiunea de monostrat proteic, cu o structură etirată, a dispărut complet.

Mozaicul este *fluid*, adică diferiții săi constituenți lipidici și protidici nu sînt ficși. „Marea lipidică" în care se află „aisbergurile" constituite din proteine este fluidă, deci, cu lipidele stratului dublu în stare de cristal lichid, iar în planul său proteinele se pot deplasa lateral sau se pot roti în jurul axului propriu, perpendicular pe planul membranei. Interacțiunile lipid-lipid, proteină-lipid și lipid-proteină din interiorul membranei nu sînt covalente. Rezultă o mișcare continuă și o difuziune a constituenților membranari în planul membranei.

Rezultatele obținute prin numeroase tehnici biofizice și biochimice confirmă modelul mozaicului fluid. În același timp, ideile esențiale care stau la baza sa, au contribuit cu certitudine la generarea de noi ipoteze de lucru în cercetare și, prin aceasta, la dezvoltarea efectivă a cunoașterii biomembranelor. Ca urmare, nu există rezerve majore care să conteste validitatea sa. Cel mult putem cita o apreciere recentă (1986) a lui J. D. Robertson care pune în discuție faptul că se susține incompatibilitatea modelului mozaicului fluid cu modelul unităților de membrană (51). În opinia sa, cele două modele ar fi diferite doar cantitativ, modelul său neexcluzînd fluiditatea membranei. Ceea ce ar fi nou constă în implicarea unor unități de membrană în menținerea hidrofobicității din interiorul stratului dublu lipidic.

Confirmarea modelului mozaicului fluid este foarte clară și are ca suport atît date ultrastructurale cît și de ordin funcțional. Proba ultrastructurală decisivă a fost obținută prin criofractura membranelor asociată cu microscopia electronică, procedeu ce permite punerea în evidență a proteinelor integrale din membrană (a se vedea Cap. VII). Cînd fractura consecutivă congelării trece prin centrul membranei, separă cele două monostraturi ale stratului bilipidic și expune partea centrală a membranei. În general, fractura nu rupe lanțul polipeptidic al unei proteine, aceasta rămînînd asociată cu monostratul la care proteina posedă interacțiunile cele mai puternice. Suprafețele de fractură corespunzînd monostratului lipidic intern (notată PF, sau P) și, respectiv, monostratului lipidic extern (notată EF, sau E) vor prezenta o serie de particule care reprezintă proba existenței proteinelor integrale (fig. 27). Cu alte cuvinte, criofractura atestă indubitabil caracterul de mozaic al membranei, matrice lipidică în care sînt inserate proteinele. Aceasta nu înseamnă că vechea imagine trilamelară a membranei, obținută la microscopia electronică prin transmisie, prin procedee uzuale de fixare, reprezintă un artefact. Ea este doar expresia limitelor unei tehnici (48).

Scanned with OKEN Scanner

Cea de a doua caracteristică, a modelului actual al biomembranelor, fluiditatea a beneficiat de o atestare deplină, demonstrîndu-se, așa cum se poate constata din subcapitolele anterioare, că la temperatura fiziologică stratul dublu este fluid, moleculele lipidice și proteinele integrale sînt libere să difuzeze, în principal în planul membranei, deplasarea fiind în medie de 1 $\mu m\ sec^{-1}$ pentru lipide și de 1 $\mu m\ min^{-1}$ pentru proteine.

Fluiditatea globală a membranei tinde să devină un important reper obiectiv în explicarea unor procese fiziologice. Modulatorii naturali ai fluidității sau al complementului său, microviscozitatea membranei, se pot distinge în funcție de natura lor, în chimici și fizici (tabel VI). Toți acești factori au fost analizați în amănunt (56, 57) și în prezent au început să se contureze metode de

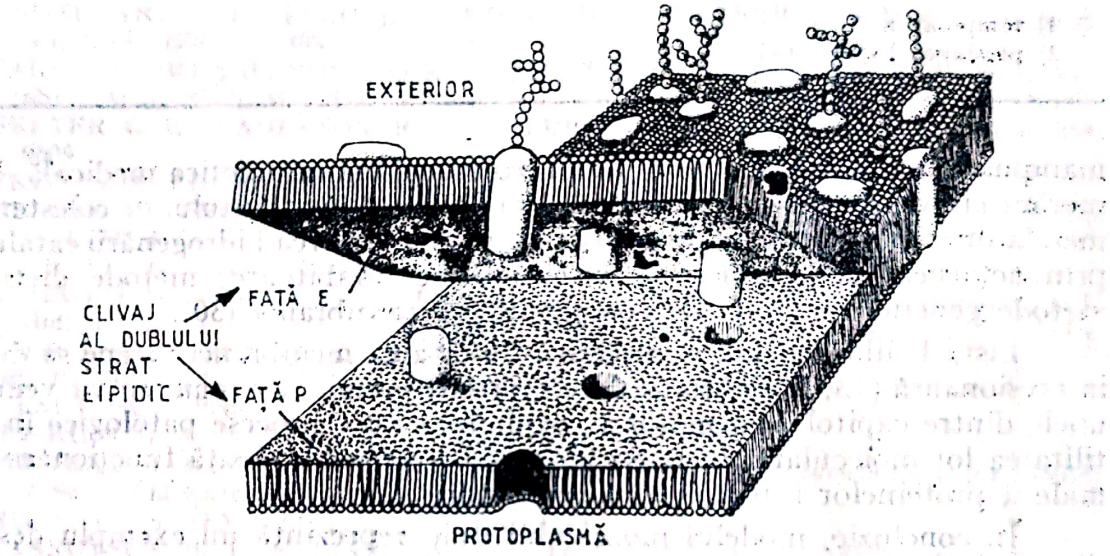


Fig. III. 27 — Reprezentare schematică a clivajului dublului strat lipidic obținut prin criofractura în vid (După B. Satir, 1975; preluat din ref. 77).

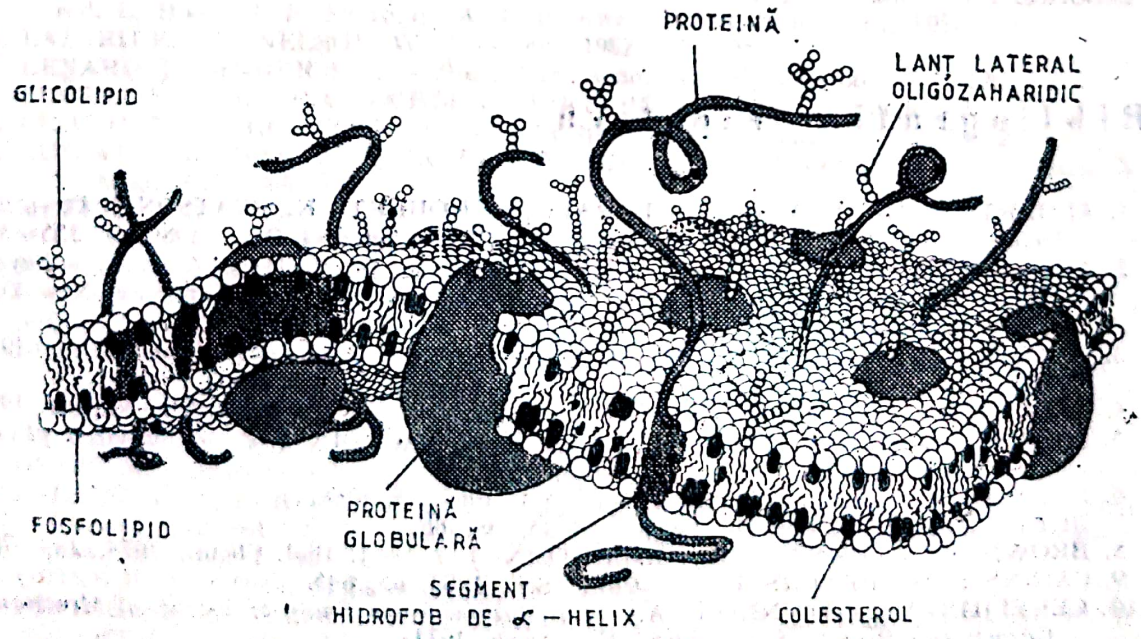


Fig. III. 28 — Membrana citoplasmatică: reprezentare ipotetică a organizării structurale cu integrarea unor date actuale. (După M. Bretscher, 1985) (7).

Scanned with OKEN Scanner

TABEL VI

Modulatori fiziologici ai microviscozității membranei (După M. Shinitzky, 1984) (56)

A. *Modulatori chimici*

1) concentrația colesterolului (colesterol/fosfolipide);
2) gradul de nesaturare a lanțurilor acizilor grași din fosfolipide;
3) nivelul sfingomielinei (sfingomielină/lecitină);
4) fosfatidiletanolamina;
5) conținutul de proteine în membrană (proteine/lipide).

B. *Modulatori fizici*

1) temperatura;
2) presiunea hidrostatică.

manipulare a fluidității utile atît în cercetare cît și în practica medicală. Enumerăm cîteva dintre aceste metode: modificarea conținutului în colesterol al membranei; încorporarea de acizi grași; prin utilizarea hidrogenării catalitice; prin acțiunea Ca^{2+}; utilizarea unor enzime inhibitoare; metode dietetice; metode genetice; metode de compresiune a membranei (30).

Lista bolilor în care se modifică fluiditatea membranei începe să devină impresionantă (13, 57). Alterările fluidității permit, așa cum se va vedea în unele dintre capitolele următoare, explicarea unor procese patologice în subtilitatea lor moleculară, în particular prin obstrucția creată funcționării normale a proteinelor integrale din membrană.

În concluzie, modelul mozaicului fluid reprezintă un exemplu desăvîrșit despre modul în care un concept inspirat, deși sprijinit în parte pe o serie de ipoteze, poate propulsa cercetarea științifică din domeniul pentru care a fost elaborat.

Bibliografie selectivă

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. — *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986, pp. 255—315.
2. ANDREOLI T. E., HOFFMAN J. F., FANESTIL D. D., SCHULTZ S. G. — *Physiology of Membrane Disorders*, Ediția a II-a, Plenum Medical Book Company, New York and London, 1986.
3. BANGHAM A. D., HILL M. W., MILLER N. G. A. — *Methods Membr. Biol.*, 1974, 1, 1.
4. BENGA GH. — *Biologia moleculară a biomembranelor*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
5. BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P., LACROIX J.-P. — *Biologie et physiologie cellulaire*, vol. I, Hermann, Paris, 1977.
6. BRANTON D. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 1048.
7. BRETSCHER M. — Pour la Science, 1985, 98, 66.
8. BROWN M. S., DANA S. E., GOLDSTEIN J. L. — J. Biol. Chem., 1974, 249, 789.
9. CAIRNS S. R., PETERS T. J. — Clin. Sci., 1983, 65, 645.
10. CEREIJIDO M., ROTUNNO C. A. — *Introduction to the Study of Biological Membranes*, Gordon and Breach, Sci. Publsh., New York, 1971.
11. CHAPMAN D., BENGA GH. — *Biological Membranes*, vol. 5, D. Chapman, edit., Academic Press, London, 1984, pp. 1—56.

Scanned with OKEN Scanner

12. CLARKE S. — J. Biol. Chem., 1975, 250, 5459.
13. COOPER R. A. — N. Engl. J. Med., 1977, 297, 371.
14. CULLIS P. R., B. DE KRUIJFF, MC GRATH A. E., MORGAN C. G., RADDA G. K. — *Structure of Biological Membranes*, (sub red. S. Abrahmsson, I. Pascher), Plenum Press, New York and London, 1977, pp. 389—407.
15. DEAMER D. W. ,LEONARD R., TARDIEU A., BRANTON D. — Biochim. Biophys. Acta, 1970, 219, 47.
16. DEATHERAGE J. F., HENDERSON R., CAPALDI R. A. — J. Mol. Biol., 1982, 158, 501.
17. DE KRUIJFF B., DEMEL R. A. — Biochim. Biophys. Acta, 1974, 339, 57.
18. DE ROBERTIS E. D. P., DE ROBERTIS Jr. E. M. F. — *Biologie cellulaire et moléculaire*, Les Presses de L'Université Laval, Québec, Maloine S.A. édit., Paris, pp. 135—169.
19. DEVAUX P. F., SEIGNEURET M. — Biochim. Biophys. Acta, 1985, 822, 63.
20. DINCULESCU I., ONICESCU D., BENGA GH., POPESCU L. M. — *Biologie celulară*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1983, pp. 40—57.
21. ENGELHARD V. H., ESKO J. D., STORM D. R., GLASER M. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 4882.
22. FARIAS N., BLOJ B., MORERO R. D., SINERIZ F., TRUCCO R. E. — Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 231.
23. FRETER C. E., LADENSON R. C., SOLBERT D. F. — J. Biol. Chem., 1979, 254, 9609.
24. FRYE L. D., EDIDIN M. — J. Cell Sci., 1970, 7, 319.
25. GLASER M., FERGUSON K. A., VAGELOS R. P. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4072.
26. GUIDOTTI G. — Arch. Intern. Med., 1972, 129, 194.
27. GUIDOTTI G. — *Physiology of Membranes Disorders*, (sub. red. T. E. Andreolli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York, and London, 1986, pp. 45—55.
28. HARRISON R., LUNT G. G. — *Biological Membranes*, Ediția a II-a, Blackie, Glasgow and London, 1980.
29. HOPKINS G. J., WEST C. E. — *Lipids*, 1977, 12, 327.
30. HOUSLAY M. D., STANLEY K. K. — *Dynamics of Biological Membranes*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, 1983.
31. HUI S. W., STERWART T. P. — Nature, 1981, 290, 427.
32. KARNOVSKY M. J., KLEINFELD A. M., HOOVER R. L., KLAUSNER R. D. — J. Cell Biol., 1982, 94, 1.
33. KEPES A. — *Aspects moléculaires des fonctions membranaires*, Masson, Paris, 1978.
34. La CELLE P. L., WEED R. I., SANTILLO P. A. — în *Membrane and Disease* (sub red. L. Bollis, J. F. Hoffman, A. Leaf, Raven Press, New York, 1976.
35. LAZARIDES E., NELSON W. J. — Cell, 1982, 31, 505.
36. LENARD J., SINGER S. J. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1828.
37. LING G. N., MILLER C., OCHSENFELD M. M. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, 204, 6.
38. LING G. N., NEGENDANK W. G. — Perspectives Biol. Med., 1980, 23, 215.
39. LUZZATI V., REISS-HUSSON F., RIVAS E., GULIK-KRZYWICKI T. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, 409.
40. MEYER H. W. — Exp. Path., 1983, 23, 3.
41. MILLER R. G. — Nature, 1980, 287, 166.
42. MUHLETHALER K. — Acta Histochemica, 1981, Suppl. 23, 117.
43. NELSON W. J., LAZARIDES E. — Nature, 1983, 304, 364.
44. NICOLSON G. L., SINGER S. J. — J. Cell Biol., 1974, 60, 236.
45. NODA M., TAKAHASHI H., TAMABE T., TOYOSATO M., KIKYYOTANI S., FURUTANI Y., HIROSE T., TAKASHIMO H., INAYAMA S., MIYATA T., NUMA S. — Nature, 1983, 302, 528.
46. OP DEN KAMP J. A. F. — Ann. Rev. Biochem., 1979, 48, 47.
47. OSTRO M. — Pour la Science, 1987, 113, 76.
48. PALADE G. E., FARQUHAR M. G. — *Pathophysiology — The Biological Principles of Disease*, (sub red. L. H. Smith Jr., S. O. Their), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1981, pp. 1—56.
49. QUINN P. J. — Prog. Biophys. Molec. Biol., 1981, 38, 1.
50. RINTOUL D. A., CHOU S. M., SILBERT D. F. — J. Biol. Chem., 1979, 254, 10070.
51. ROBERTSON J. D. — *Physiology of Membranes Disorders* (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Campany, New York and London, 1986, pp. 3—24.

Scanned with OKEN Scanner

IV. Transportul prin membranele biologice

„Fiziopatologia alterărilor de la nivelul membranelor biologice necesită înțelegerea: — compoziției și structurii biomembranelor; — a regulilor fizice care guvernează procesele de transport membranar: — a căilor prin care modulatorii chimici, deopotrivă fiziologici sau farmacologici, reglează sau modifică procesele de transport și a modalităților prin care aceste evenimente sînt implicate în fenomene ca reglarea volumului celular, transmiterea semnalelor în celulele excitabile, comunicarea intercelulară și procesele secretorii din epitelii".

T. E. ANDREOLI, J. F. HOFFMAN, D. D. FANESTIL (1986)

Biomembranelor li se atribuie în ansamblu trei categorii de funcții: a) rol de frontieră fizică, dar și barieră de permeabilitate selectivă, la nivelul biomembranelor producîndu-se fenomene de transport de o mare diversitate; b) formarea matricei pentru localizarea unor funcții celulare de bază, în special în cazul secvențelor enzimatice (în particular, în cazul membranei mitocondriale și a reticulului endoplasmic); c) proteinele membranei celulare, îndeosebi glicoproteinele, au un rol important ca receptori în cadrul comunicării intercelulare (a se vedea cap. V) și în determinarea locurilor de recunoaștere celulară (în particular, în cazul celulelor componente ale sistemului imunitar) (56).

În cele ce urmează ne vom referi la fenomenele de transport prin membranele celulare. Aflate cel mai frecvent reunite în țesuturi, sau mai rar, libere să circule într-un teritoriu circumscris din organism, celulele primesc din lichidele interstițiale și plasmatice, o serie de substanțe necesare pentru exprimarea lor funcțională. Primele rezultate experimentale asupra schimbului celular de substanțe cu mediul extracelular au fost obținute cu mult înainte de atestarea existenței membranei. De altfel, o serie dintre aceste rezultate au constituit prin ele însele primele argumente certe asupra realității structurale a plasmalemei (a se vedea cap. II). După o îndelungată perioadă de descriere aproape exclusiv fenomenologică, abia de dată recentă o serie de procese de transport de la nivelul biomembranelor au putut fi corelate cu certitudine cu structurile moleculare care le determină. Cea mai clară corelație s-a obținut, pentru moment, în cazul plasmalemei eritrocitare datorită avansului în cunoașterea proteinelor de la nivelul membranei hematiei. De altfel, datele prezentate în capitolul referitor la globulul roșu (VII), pot fi considerate complementare, ținînd seama de caracteristicile, în linii generale asemănătoare, ale membranelor plasmatice aparținînd diferitelor tipuri celulare.

Imaginea asupra proceselor de transport membranar a evoluat progresiv, dar cu toate că datele experimentale acumulate sînt de o amplitudine extremă, cunoașterea precisă a bazelor moleculare ce generează aceste fenomene se află încă într-o etapă analitică. În aceste condiții, vom invoca din nou dificultatea selecției unor aspecte cît mai relevante.

Scanned with OKEN Scanner

Pînă în prezent au fost delimitate clar o serie de tipuri fundamentale de transport, care coexistă la nivelul plasmalemei în proporții variate, funcție de tipul celular considerat. La celulele izolate „disecția" experimentală a diferitelor tipuri de transport este mai ușor de obținut. În cazul confederațiilor de celule, țesuturi (în particular epitelii) și organe se regăsesc aceleași tipuri fundamentale de transport, dar în mod inerent în alternative complexe, care țin deopotrivă de caracteristicile celulelor componente, și de specializarea funcțională a ansamblurilor structurale. Există, de asemenea, procese complexe de transport interorgane descrise în termeni mai precișii abia de dată recentă (1, 6, 9, 30, 33). Nu vom aborda acest aspect, altfel de interes major în medicină, referindu-ne în continuare doar la tipurile fundamentale de transport de la nivelul membranei plasmatice. Expresia funcțională a transportului prin membrană a fost definită inițial sub termenul vag de permeabilitate celulară. Ulterior, s-a consacrat denumirea de permeabilitate selectivă a membranei, care, deși nu cuprinde în semnificația sa tot ansamblul formelor de transport, este utilizată și în prezent.

Imaginea actuală de ansamblu asupra permeabilității selective a membranei este următoarea: permeabilitatea restrînsă a stratului bilipidic, limitată doar la moleculele liposolubile este crescută și făcută selectivă prin intermediul moleculelor proteice inserate în stratul dublu lipidic fluid. Proteinele acționează în calitate de: canale sau pori pentru ioni variați; transportori specifici pentru metaboliți ca aminoacizii și monozaharidele; „pompe" care concentrează preferențial diferiți ioni (de exemplu K^+) și care scad concentrația altora (Na^+, Ca^{2+}). Efectele principale care decurg din procesele de transport de la nivelul biomembranelor sînt: a) extragerea din mediu a unor substanțe energetice sau structurale cu concentrarea lor consecutivă intracelulară; acest fenomen se produce în cuasitotalitatea celulelor și coexistă cu eliminarea substanțelor toxice, respectiv, a deșeurilor metabolice, dar și a unor molecule utile; b) reglarea volumului celular, concomitent cu menținerea pH-ului și a compoziției ionice celulare, în special în cazul K^+, într-o homeostazie moleculară strict reglată pentru crearea unui mediu favorabil activităților enzimatice, inclusiv pentru cele implicate în sinteza proteinelor; c) în cazul celulelor neuronale și musculare, în mod particular, se creează gradienți ionici indispensabili excitabilității, adică potențialul de repaus (49).

Cea mai frapantă consecință a permeabilității plasmalemei rămîne compoziția ionică net diferită față de mediu, prezentă la toate celulele „de la cele mai simple creaturi din oceane, pînă la celulele complexe nutrite prin intermediul sîngelui" (35).

În tabelul I sînt prezentate concentrațiile intracelulare și extracelulare ale unor substanțe. Este, desigur, cazul unor valori medii raportate la ceea ce se numește celulă tip.

Datele menționate în tabel constituie expresia unei homeostazii moleculare de importanță capitală în expresia fiziologică a celulei. Valorile conținute în tabelul I corespund la ceea ce se numește stare staționară, de echilibru dinamic. Episodic, în cadrul diferitelor procese fiziologice concentrațiile unor substanțe variază, pentru ca ulterior să se revină la starea staționară. Cele mai semnificative diferențe de concentrație sînt în cazul ionilor de Na și K. Cl^- este, de asemenea, repartizat asimetric, aflîndu-se în concentrație mai mare în lichidele extracelulare. Dimpotrivă, fosfații, pentru cea mai mare parte a intermediarilor metabolici organici, ca și proteinele, sînt mult mai abundenți

Scanned with OKEN Scanner

TABEL I

Compoziția biochimică a lichidelor extracelulare și intracelulare
(După A. C. Guyton, 1984, modificat) (18)

Substanța	Lichid extracelular (mEq/l)	Lichid intracelular (mEq/l)
Na^+	142	5 — 15
K^+	4 — 5	140 — 142
Ca^{2+}	2,5 — 5	< 1 ($\leqslant 10^{-7}$M sub formă liberă)
Mg^{2+}	3	58
Cl^-	103 — 110	4
HCO_3^-	28	10
Fosfați	4	75
SO_4^{2-}	1	2
Glucoză	900 mg ‰	0 — 200 mg ‰
Aminoacizi	300 mg ‰	2000 mg ‰
Colesterol, Fosfolipide, Grăsimi neutre	5 g ‰	20 — 95 g ‰
PO_2	35 mmHg	20 mmHg?
PO_2	46 mmHg	50 mmHg?
pH	7,4	~ 7,0
Proteine	8 g ‰ (50 mEq)	160 g ‰ (400 mEq)

în interiorul celulelor față de mediul extern al acestora. Asimetria de repartiție a acestor substanțe este cuprinsă în prezent în însăși definiția vieții. Ea rezultă din coexistența sistemelor de transport de la nivelul biomembranelor.

1. TIPURI DE TRANSPORT

O clasificare care să reunească toate tipurile de transport este mai dificilă, din cauza cunoașterii inegale a acestora, care rămîne în raport direct cu datele reduse asupra structurii intime a proteinelor din membrană.

Dacă ne referim la totalitatea proceselor de transport prin membrană, cea mai netă distincție se poate efectua între transportul ionilor sau moleculelor mici și cel al macromoleculelor și particulelor. Se pot deosebi astfel *sisteme de microtransfer* și *sisteme de macrotransfer* prin membrane (28). Între aceste două sisteme diferențele sînt nete. Astfel, ionii și moleculele mici trec cu adevărat prin membrană, mai rar prin stratul dublu lipidic și mai frecvent prin proteinele intrinseci ale membranei. Dimpotrivă, macromoleculele și particulele trec efectiv o dată cu un fragment din membrană, deoarece sînt transportate în vezicule ce se desprind din plasmalemă.

În cazul sistemelor de microtransfer de la nivelul membranei, cel mai clar criteriu pînă în prezent, constă în discriminarea din punct de vedere al consumului de energie, de regulă provenită prin hidroliza ATP. Se disting

Scanned with OKEN Scanner

astfel două tipuri de transport, pasiv și activ (fig. 1). *Transportul pasiv* se produce fără consum de energie, substanțele trecînd în acest caz în sensul gradientului de concentrație, pentru moleculele neîncărcate electric, sau în sensul gradientului electrochimic pentru ioni. *Transportul activ* se efectuează împotriva gradientului de concentrație sau electrochimic și, de aceea, se va produce un consum de ATP. Frecvent însă fluxurile ionice de la nivelul mem-

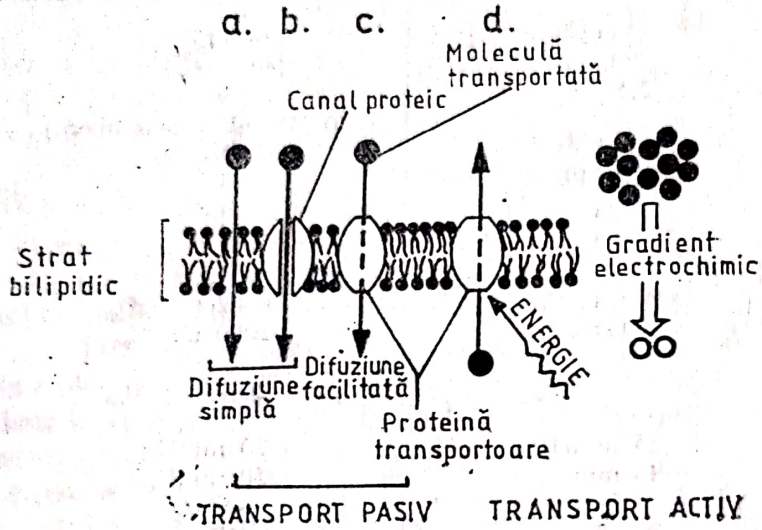


Fig. IV. 1 — Transportul pasiv și activ. Sînt reprezentate schematic tipurile de transport pasiv și transportul activ primar.

branei sînt rezultatul ambelor tipuri de transport. De aceea, este necesară realizarea distincției dintre componenta activă și cea pasivă a unui anumit flux. Existența fluxurilor ionice active poate fi pusă în evidență prin mai multe metode: radioizotopice, metoda curentului de scurtcircuit (elaborată de H. H. Ussing și adecvată numai epiteliilor, deoarece necesită compartimente mari și accesibile) și prin utilizarea de blocanți specifici ai transportului activ (52). Ultima modalitate este cea mai simplă și cea mai răspîndită. Se utilizează în acest scop frecvent ouabaïna (g-strofantină), tonicardiac, dar și blocant direct al pompei de sodiu și potasiu din membrană la concentrații foarte reduse, avînd în plus calitatea de conservare a metabolismului oxidativ celular.

În prezent, clasa inhibitorilor specifici ai transportului pasiv sau activ este foarte amplă. Devine astfel posibilă suprimarea strict specifică a unor subtipuri variate pe care le prezintă pentru diferiți ioni, îndeosebi transferul pasiv.

Un ultim criteriu decurge din concluzia conturată în ultimii ani, că majoritatea substanțelor sînt transportate prin *proteine de transport*. După numărul speciilor de substanțe transportate se pot distinge în acest caz *sisteme uniport* și *sisteme de cotransport*. Cînd este transportată prin membrană o singură substanță sistemul se numește uniport. Dacă în sistem transferul unei substanțe este cuplat cu cel al unei alte substanțe rezultă un cotransport, prin care se poate realiza trecerea ambelor substanțe în aceeași direcție —*simport*—, sau în direcție opusă — *antiport* (fig. 2). În realitate, fenomenele de cotransport pot angaja și mai mult decît două substanțe diferite, îndeosebi în cazul ionilor. Recent s-a propus, de exemplu, un sistem de cotransport Na-K-2Cl (36). Fenomenele de cotransport pot constitui un argument pentru existența la nivelul membranei a unor proteine multifuncționale, implicate con-

Scanned with OKEN Scanner

TABEL II

Tipuri de transport prin biomembrane

SISTEME DE MICROTRANSFER

I — *Transport pasiv*
- 1 — Difuziune simplă — a) prin stratul bilipidic, b) mediată de peptide.
- 2 — Difuziune facilitată.
- 3 — Difuziune simplă prin proteine-canal.

II — *Transport activ*
- 1 — Transport activ primar.
- 2 — Transport activ secundar.
- 3 — Translocație de grup.

SISTEME DE MACROTRANSFER

I — *Transport direct al macromoleculelor*

II — *Transport prin vezicule*
- 1 — Endocitoză: a) Pinocitoză: — independentă de receptori, — dependentă de receptori. b) Fagocitoză.
- 2 — Exocitoză.
- 3 — Transcitoză.

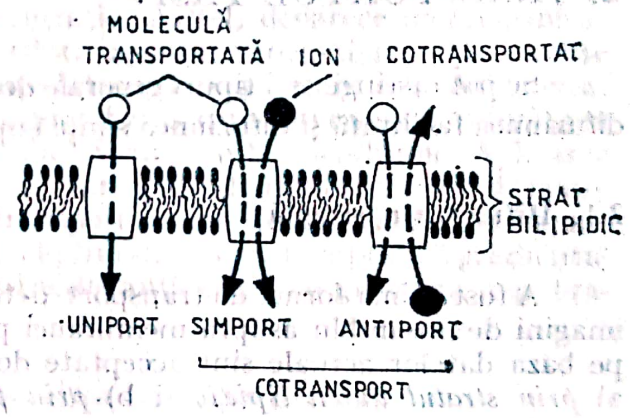


Fig. IV. 2 — Reprezentare schematică a proteinelor de transport funcționînd ca sisteme uniport și de cotransport (simport și antiport).

comitent în transportul mai multor ioni. În fond, numărul de specii moleculare polipeptidice din membrană este relativ redus. Menționăm, de asemenea, că tipurile de transport după numărul speciilor transportate se regăsesc atît în cadrul transportului pasiv cît și al celui activ. Existența proteinelor de transport incită, pe lîngă conturarea unui nou criteriu de clasificare, chiar la reconsiderarea celor două concepte esențiale: transport pasiv și transport activ. Pentru că, de fapt, multe din transporturile considerate pasive sînt cuplate indirect și, de aceea, mai dificil de pus în evidență experimental, la un proces metabolic furnizor de energie. În cazul transportului pasiv prin intermediul proteinelor de transport această relație este directă, deoarece atît pentru sinteza cît și pentru menținerea proprietăților proteinelor se consumă energie.

Prezentarea globală a proceselor de transport prin membrane poate fi efectuată urmărind trei criterii diferite: a) mecanismele diferitelor tipuri de

transport; b) categoriile de substanțe (molecule, ioni) transportate; c) limitarea analizei transportului în cazul membranei plasmatice a unui anumit tip celular sau în cazul unui țesut, ori barieră fiziologică. Prima alternativă, pe care o vom urma, prezintă avantajul unei orientări de ansamblu, pe lîngă faptul că poate cuprinde referiri la toate cele cinci categorii de substanțe transportate, în proporții diferite, la nivelul membranei: 1) apă; 2) metaboliți (ca glucoza și aminoacizii); 3) gaze (O_2 și CO_2); 4) ioni (în particular Na^+, K^+, Ca^{2+}); 5) alte molecule organice (îndeosebi medicamente și toxice). A treia alternativă este de interes în medicină, iar noi am ilustrat-o pentru membrana eritrocitară (a se vedea cap. VII).

Analiza proceselor de transport la nivelul epiteliilor, țesuturilor și a unor bariere fiziologice particulare (de exemplu, bariera hemato-encefalică), deși de cea mai mare utilitate în explicarea unor fenomene fiziologice și patologice, depășește obiectivele (și spațiul) acestei lucrări. În principiu, la nivelul structurilor menționate se reunesc, în alternative foarte variate, toate tipurile fundamentale de transport.

În clasificarea proceselor de transport am utilizat, în mare parte, sistematizarea propusă de B. Alberts și colab. (1) și Gh. Benga (4), prezentă de altfel, parțial sau global și în alte referințe (2, 6, 11, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 30, 31, 33, 39, 41, 48, 49, 50).

2. TRANSPORTUL PASIV

Se pot distinge trei tipuri generale de transport pasiv: difuziunea simplă, difuziunea facilitată și difuziunea simplă mediată prin proteine canal.

2.1. Difuziunea simplă

A fost prima formă de transport detectată, mult anterior conturării unei imagini de ansamblu asupra membranei plasmatice. După numeroase studii, pe baza datelor actuale sînt acceptate două modalități de difuziune simplă: a) *prin stratul dublu lipidic* și b) *prin proteinele intrinseci* ale membranei.

În cazul *difuziunii simple prin stratul bilipidic* primele rezultate experimentale, valabile și azi, aparțin lui Overton, care a constatat că viteza de pătrundere a substanțelor în celule este proporțională cu solubilitatea acestora în lipide. Întrucît rezultatele au fost obținute la sfîrșitul secolului trecut, cînd datele despre compoziția membranei erau reduse, Overton a ajuns totodată la concluzia că membrana este alcătuită dintr-un film subțire lipidic (3). Gradul de solubilitate în lipide se poate măsura prin coeficientul de partiție al substanței între ulei/apă. Coeficientul a fost determinat experimental pentru numeroase substanțe, prin efectuarea unui amestec ulei/apă, în care se introduce substanța de cercetat. Urmează agitarea amestecului, iar după separarea fazelor, determinarea concentrației în fiecare din cele două faze. Exprimat sub forma raportului solubilitate în ulei/ solubilitate în apă ale substanței considerate, coeficientul de partiție va avea o valoare cu atît mai mare cu cît substanța este mai liposolubilă (hidrofobă).

Scanned with OKEN Scanner

În acest mod s-a stabilit, de exemplu, relația dintre efectul narcoticelor și coeficientul de partiție ulei/apă determinat la mormoloc (a se vedea tabelul III).

TABEL III

Relația dintre efectul narcoticelor și coeficientul de partiție ulei/apă. (După Meyer-Overton, 1902, preluat din referința 123).

Narcotic	Concentrația narcoticului (μM)	Coeficient de partiție ulei/apă
Etanol	600	0,03
Propanol	110	0,13
Valeramidă	50	0,07
Eter	24	2,4
Salicilamidă	2	14
Timol	0,055	600

Curînd însă, s-a constatat, îndeosebi de către Collander și Barlund, că pe lîngă liposolubilitate intervine și volumul molecular al substanței, ceea ce a condus la corelarea celor două caracteristici în definirea permeabilității unei substanțe.

Pentru analiza precisă a difuziunii simple a fost importantă analogia cu difuziunea ca proces fizic, care reprezintă un transport microscopic de substanțe legat exclusiv de diferențele de concentrație. Astfel, deoarece mediile intra- și extracelular sînt reprezentate de soluții apoase, procesul fizic pe care se bazează schimbul reciproc de substanțe între celule și mediu este difuziunea. De aceea, a fost posibilă utilizarea legilor fizice care guvernează difuziunea (elaborate de Fick în 1885) în studiul difuziunii prin biomembrane. Aplicarea legilor Fick s-a dovedit extrem de utilă, reprezentînd prima încercare de cuantificare precisă a unui fenomen de transport membranar, utilizată constant pînă în prezent (38, 49). Legea a I-aFick, ținînd seama de faptul că gradientul de concentrație se stabilește practic pe o distanță egală cu grosimea membranei, poate fi scrisă astfel:

$$\frac{dm}{dt} = -S\frac{D}{x}(c_1 - c_2) = -SP(c_1 - c_2)$$

unde dm/dt reprezintă rata sau viteza de difuziune: x constituie grosimea membranei; c_1 și c_2 = concentrațiile substanței considerate de o parte și de alta a membranei, iar D/x = P reprezintă coeficientul de permeabilitate. P este exprimat de obicei în cm/s și reprezintă viteza de pătrundere prin membrană a diferitelor substanțe, în condiții date ale diferenței de concentrație. Calcularea coeficientului de permeabilitate devine posibilă prin măsurarea fluxurilor de substanțe, respectiv, influxul sau/și efluxul. Prin flux se înțelege cantitatea de substanță care intră sau iese în unitatea de timp din compartimentul considerat (intra-sau extracelular). Pentru calcul este necesară cunoașterea suprafeței de schimb și diferența de concentrație a substanțelor (31). Metodele cele mai utilizate în acest scop sînt cele radioizotopice, prin intermediul cărora au fost determinați coeficienții de permeabilitate pentru diferite membrane și substanțe.

Scanned with OKEN Scanner

Corelarea constantei de permeabilitate cu coeficientul de partiție ulei/apă a confirmat abilitatea substanțelor de a traversa membrana în funcție de gradul lor de solubilitate. Prin utilizarea mai recent a membranelor artificiale, alcătuite din straturi lipidice duble, au fost obținute argumente suplimentare în acest sens.

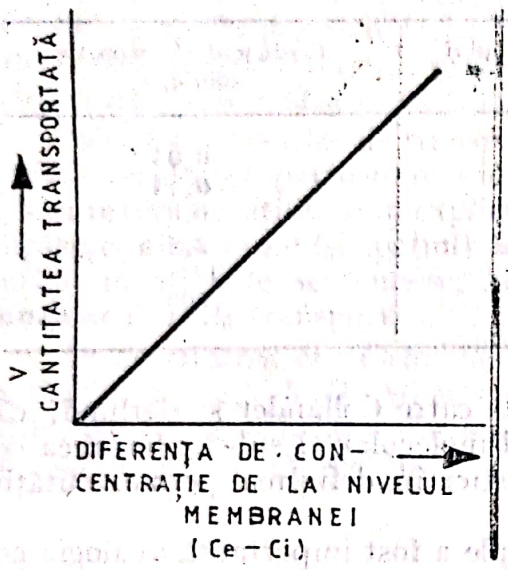


Fig. IV. 3 — Cinetica trecerii unei substanțe prin membrană consecutiv difuziunii simple.

O serie de substanțe sînt solubile atît în lipidele membranare cît și în apă. Este cazul îndeosebi al oxigenului, oxidului de carbon, alcoolului, acizilor grași și al altor compuși mai puțin importanți. În contact cu membrana, aceste substanțe se dizolvă imediat în stratul bilipidic și continuă să difuzeze exact ca în mediul hidric situat de o parte și de alta a membranei. Totuși, microviscozitatea stratului dublu lipidic (a se vedea cap. III) este de circa 300 de ori mai mare decît a apei, ceea ce conduce la o difuziune mai lentă. Dimpotrivă, o substanță cu o liposolubilitate accentuată va traversa cu ușurință membrana. Astfel, dacă solubilitatea unei anumite substanțe depășește de mai mult de 300 de ori hidrosolubilitatea sa, aceasta difuzează prin membrană chiar mai rapid decît în mediile apoase (18).

Aplicarea regulii Overton rămîne în prezent utilă în predicția gradului de trecere prin biomembrane a unor medicamente, în funcție de solubilitatea în lipide (36). Concomitent însă au fost constatate și abateri de la această regulă, ca în cazul apei, ureei, metanolului și al altor substanțe, în general neelectroliți hidrofili cu greutate moleculară mică.

Explicarea permeabilității mari a membranei pentru apă și moleculele mici hidrofile a suscitat numeroase cercetări și implicit controverse (a se vedea cap. VII). Pentru cel puțin o parte dintre aceste substanțe este probabilă *difuziunea simplă mediată de proteine*.

Difiziunea apei prin membrane este mult mai intensă decît a oricărei alte substanțe, încît în acest caz aparent se ignoră barierele celulare. De exemplu, cantitatea de apă care traversează membrana eritrocitară în cele două sensuri în fiecare secundă are o amploare corespunzînd la circa 100 de ori volumul hematiei. În mod normal, trecerile moleculelor de apă într-un sens sau altul sînt strict echivalente, încît fluxul net este nul. Volumul celular ră-

Scanned with OKEN Scanner

mîne, de asemenea, constant. Totodată, în anumite condiţii poate apare o diferenţă de concentraţie transmembranară pentru apă, în mod asemănător cu alte substanţe. În acest caz, există un flux hidric net care traversează membrana celulară, conducînd în funcţie de sensul său la turgescenţa sau la retracţia (ratatinarea) celulei. Acest flux hidric provocat printr-o diferenţă de concentraţie reprezintă fenomenul de *osmoză*, primul proces de membrană pus în evidenţă experimental de Dutrochet încă din 1809, deci, mult anterior oricărei idei precise asupra membranei celulare. Fluxul hidric osmotic net se produce ori de cîte ori la nivelul compartimentelor intra-sau extracelular (unul în raport cu celălalt) există o concentraţie crescută de ioni nedifuzibili. Ca urmare, se va produce o deplasare a moleculelor de solvent (apă) prin membrană în compartimentul unde există o concentraţie mai crescută a unor solvenţi pentru care membrana este impermeabilă. Osmoza are importanţă deosebită în diferite procese fiziologice. Tendinţa mişcării moleculelor de solvent către regiunea unde solvitul (solviţii) este mai concentrat poate fi obstrucţionată prin aplicarea unei presiuni la nivelul soluţiei mai concentrate. Este denumită *presiune osmotică efectivă* a soluţiei, presiunea care trebuie aplicată pentru împiedicarea migrării solventului. O explicaţie a osmozei se bazează pe teoria cinetico-moleculară. Astfel, în soluţia mai puţin concentrată moleculele de solvent (apă) prezintă o agitaţie moleculară, sau o activitate mai mare decît moleculele de solvent din soluţia mai concentrată, a căror activitate este obstrucţionată de numărul mare de particule ale solvitului. În consecinţă, se produce o trecere a moleculelor de solvent din zona mai puţin concentrată spre zona mai concentrată. Perturbările echilibrului osmotic generează, după cum se ştie, o serie amplă de procese patologice, constituind ca urmare obiectul unor prezentări extinse.

Experimental, permeabilitatea unei membrane pentru apă se poate determina în două situaţii: a) în absenţa unui flux net de apă prin adiţie de apă tritiată, în unul din compartimente; se constată că în condiţii de echilibru osmotic apa se supune totuşi legilor difuziunii simple; b) permeabilitatea se poate determina, de asemenea, în prezenţa unui flux net de apă rezultant al unei presiuni hidraulice sau a unei presiuni osmotice. Permeabilităţile determinate în aceste două situaţii nu sînt egale, fapt care indică un mecanism de difuziune diferit, în funcţie de prezenţa sau absenţa unui flux net. În absenţa fluxului net, difuziunea se supune primei legi Fick şi, deci, permeabilitatea determinată este o permeabilitate de difuziune. În prezenţa unui flux net de apă la nivelul membranei, difuziunea se supune legilor hidrodinamicii (legea Poiseuille). Permeabilitatea determinată în acest caz este o permeabilitate osmotică.

În cazul apei, au fost acceptate aproape sistematic trei premise: 1) celulele vii se comportă ca osmometre perfecte; 2) nu există un flux net în mediul izotonic; 3) singura barieră în fluxul apei rezidă în membrana plasmatică. Experimental s-a dovedit, însă, că doar ultima premisă este corectă, ceea ce a complicat şi mai mult factorii de variabilitate ce intervin în transportul apei (18). Un progres cert a fost obţinut prin măsurarea precisă a ratelor de transport ale apei, atît la nivelul membranelor provenind de la celulele izolate cît şi al celor tisulare (22, 27, 13). Cea mai precisă tehnică pentru stabilirea cineticii apei este rezonanţa magnetică nucleară, cu condiţia ca numărul de compartimente să fie limitat şi bine precizat. Prin această metodă s-au ob-

Scanned with OKEN Scanner

ținut mai multe diferențe semnificative între rata transportului apei la nivelul celulelor patologice în raport cu cele normale (27).

Elucidarea transportului apei prin membrană depinde, în esență, de două aspecte: a) precizarea stărilor apei, îndeosebi la nivelul intracelular, unde o parte din molecule sînt libere, iar altele „legate" îndeosebi la nivelul proteinelor; b) punerea în evidență a structurilor de la nivelul membranei, prin intermediul cărora se produce transportul; a fost presupusă, de mai mulți ani existența unor „pori apoși", de natură proteică (40). Prezența „porilor apoși" sau a unor transportori, rămîne în studiu, datele cele mai consistente fiind obținute în cazul membranei eritrocitare. Se confruntă, în esență, două ipoteze: a) existența unor pori sau canale specifice pentru transportul apei; b) canale sau pori de transport comune pentru apă și unii anioni (a se vedea cap. VII).

Deși prin tehnicile fizice cele mai recente (microscopul prin efect tunel, cu rezoluție de 3 Å!) devine posibilă „vizualizarea" moleculelor de apă, elucidarea transportului sau pe un plan mai larg, a rolului biologic al apei („matricea vieții") întîrzie.

Este posibil să se confirme în acest caz observația lui E. Schrödinger, care afirmă că deși materia vie nu eludează legile fizicii, poate să implice „alte legi ale fizicii" necunoscute încă.

Deocamdată cel mai convingător argument al existenței difuziunii simple mediate de peptide îl reprezintă *ionoforii*, polipeptide existente la microorganisme (dar obținuți și prin sinteză chimică), unii dintre ei fiind folosiți și ca antibiotice. Au fost intens experimentați atît pe membrane artificiale, cît și pe membrane naturale, deoarece au proprietatea de a crește selectiv permeabilitatea pentru ioni (32). Structural, ei sînt peptide ciclice (de exemplu, valinomicina și eniatina) sau liniare (prototip gramicidina). În funcție de mecanismul prin care crește permeabilitatea stratului bilipidic al membranei se disting două categorii de ionofori: transportori ionici mobili sau cărăuși și ionofori care formează canale. Ambele tipuri acționează prin protejarea sarcinii ionului transportor, astfel încît acesta să poată penetra în mediul intern hidrofob al stratului dublu lipidic. Deoarece nu sînt cuplați la o sursă de energie, favorizează fluxuri nete de ioni doar în sensul gradientului electrochimic (1, 32).

Ionoforii transportori ionici mobili preiau ionul de pe o parte a membranei, difuzînd prin stratul bilipidic și eliberînd apoi ionul la nivelul feței opuse a membranei, efectuînd astfel o „navetă" prin membrană. Exemple tipice din această grupă sînt valinomicina și ionoforul A 23187. Valinomicina, antibioticul natural produs de *Streptomyces*, prezintă o afinitate puternică pentru K^+, care se fixează sub forma sa deshidratată în partea centrală a moleculei. Cei 6 atomi din centrul moleculei formează o „cușcă" octaedrică în jurul ionului. Partea externă a moleculei este hidrofobă, ceea ce îi conferă solubilitate în stratul dublul lipidic și implicit difuziunea de la o față la alta. Difuziunea K^+ se va produce din compartimentul în care potențialul electrochimic este mai crescut spre compartimentul cu potențial electrochimic mai redus (fig. 4).

Ionoforul A 23187, izolat din *Streptomyces chartreusensis*, este foarte specific ca transportor mobil al cationilor bivalenți, introducînd Ca^{2+} sau Mg^{2+} în celule și transportînd apoi extracelular doi H^+ din celulă, pentru fiecare cation bivalent introdus. În felul acesta, contrar valinomicinei, el nu depolarizează membrana, producînd doar o încărcare a celulelor cu Ca^{2+}.

Scanned with OKEN Scanner

Este motivul pentru care utilizarea ionoforului A 23187 a devenit curentă în studiul metabolismului Ca^{2+} și a implicării sale în mecanismele de control (41).

Ionoforii de tip canal se dispun în stratul bilipidic pentru a forma pori transmembranari care permit trecerea selectivă a cationilor monovalenți, în sensul gradienților electrochimici. Exemplu tipic îl constituie gramicidina, peptid linear compus din 15 aminoacizi cu lanțuri laterale hidrofobe.

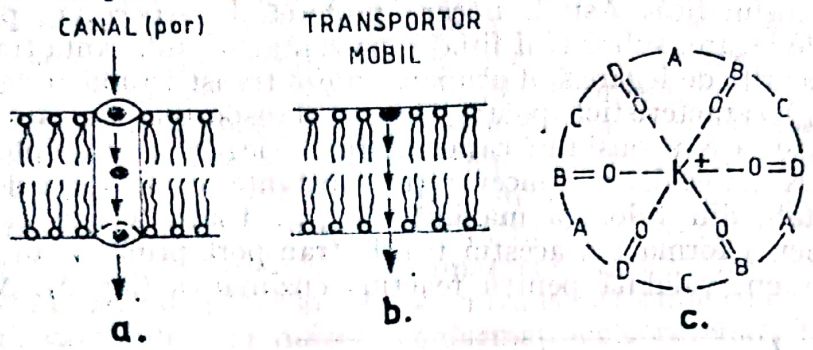


Fig. IV. 4 — Transportori de tip canal (a) și cărăuș (b). Al doilea tip este exemplificat prin complexul valinomicinei cu K^+ (c). (După Gh. Benga, 1985) (4).

Discriminarea între ionoforii „cărăuși" și de tip canal se efectuează prin reducerea temperaturii sub punctul de congelare. Transportorii mobili, spre deosebire de cei de tip canal, nu vor mai putea difuza în stratul dublu lipidic și, deci, transportul va înceta (1).

Cunoașterea ionoforilor prezintă importanță practică. Astfel, ionoforii de tip canal ca filipina, nistatina și amfotericina B, formează pori numai în membranele ce conțin steroli, ca acelea ale fungilor. De aici, utilizarea lor în practica medicală drept antimicotice (4,36).

Interesul principal în studiul ionoforilor constă, însă, în încercarea punerii în evidență a unor ionofori naturali, existenți în structura normală a biomembranelor. În felul acesta ar deveni explicabilă difuziunea simplă a ionilor, îndeosebi pentru Na^+ și K^+. Datele obținute pînă în prezent în acest sens sînt puține. Nu este exclus ca și unele lipide ale membranei, ca fosfatidilinozitolul să constituie molecule premergătoare formării unor „ionofori".

Deocamdată, se constată experimental că atît K^+ cît și Na^+ prezintă și fluxuri pasive la nivelul membranei în funcție de gradientele lor electrochimice (a se vedea cap. VII, VIII). Natura moleculară a structurilor ce permit această trecere (ionofori naturali sau canale) rămîne de precizat.

2.2. Difuziunea facilitată

Transportul mai multor substanțe, deși se produce tot de la o concentrație mai mare la una mai mică, prezintă o serie de caracteristici incompatibile cu difuziunea simplă: a) difuzează mult mai rapid (chiar de 100 000 ori) decît lasă să se prevadă liposolubilitatea și dimensiunea moleculelor; b) viteza de difuziune prezintă o saturație cînd concentrația externă a solvitului crește; c) transportul poate fi inhibat prin analogi structurali ai solvitului. Aceste caracteristici particulare se explică prin participarea la transport a unui constituient al membranei, cel mai frecvent o proteină care recunoaște și fixează mai mult sau mai puțin specific solventul, accelerînd transportul acestuia,

Scanned with OKEN Scanner

Ca și în cazul difuziunii simple, difuziunea facilitată nu conduce decît la un transport de solvit în sensul gradientului său electrochimic. Fluxul net de substanță se oprește cînd potențialul electrochimic al substanței este identic de o parte și de alta a membranei. Substanțele sînt transportate prin intermediul unor proteine specifice, care se comportă ca niște enzime legate de membrană, deoarece difuziunea facilitată prezintă caracteristici comune cu cataliza enzimatică. Astfel, fiecare proteină transportoare prezintă un loc specific de legare, substratul fiind reprezentat de substanța transportată. Cînd toate locurile de legare sînt ocupate, viteza transportului atinge o valoare maximă (V_{min}) caracteristică pentru fiecare transportor. De asemenea, fiecare transportor are o constantă caracteristică de legare a substanței transportate, notată K_m și egală cu concentrația substanței cînd viteza de transport atinge jumătate din valoarea maximă (V_{max2}). Toate aceste caracteristici permit descrierea formală a acestui tip de transport printr-o cinetică de tip Michaelis-Menten, valabilă pentru reacțiile enzimatice (fig. 5). Asemănarea

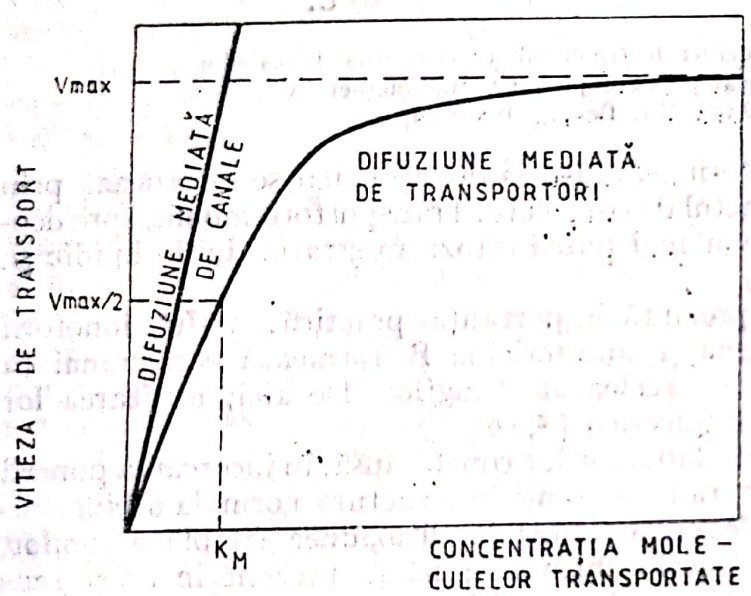


Fig. IV. 5 — Cinetica unei difuziuni simple prin intermediul canal proteic, comparată cu difuziunea facilitată printr-o proteină de transport.

cu cinetica enzimatică se extinde și în ceea ce privește inhibiția cu analogi structurali ai substratului; inhibiția necompetitivă prin ioni de metale grele și dependența de pH (1, 4, 33, 41).

Datele cele mai certe asupra difuziunii facilitate au fost obținute în cazul membranei eritrocitare, pentru transportul anionilor (îndeosebi), ureei, glicerolului și al altor neelectroliți (a se vedea cap. VII). De asemenea, există date îndeosebi cinetice, asupra transportului glucozei și al aminoacizilor prin același mecanism, la nivelul plasmalemei unor celule. Frecvent, însă, transportul glucozei și al aminoacizilor este dependent de transportul activ de sodiu și potasiu (8, 9).

Caracteristicile difiziunii facilitate au condus la afirmația că acest tip de transport nu necesită energie. Aserțiunea trebuie acceptată numai dacă ne referim la un consum direct de energie, așa cum am menționat anterior.

În ceea ce privește mecanismul prin care funcționează efectiv proteinele transportoare deocamdată datele sînt ipotetice. Totuși există argumente că mecanismul este diferit de cel al acțiunii ionoforilor și, prin extensie, al „porilor" sau „canalelor" cu existență probabilă la nivelul membranei. Unii

autori nu fac această distincție, prezentînd permeabilitatea de tip ionoforic în cadrul difuziunii facilitate (41).

Revenind la mecanismul difuziunii facilitate, din datele existente reiese că într-o primă etapă substanța transportată va fi recunoscută de un transportor pe una din fețele membranei. Fixarea se produce analog celei substrat-enzimă. Specificitatea fixării este mai mult sau mai puțin strictă, un transportor recunoscînd un solvit sau o clasă de solviți. Dacă solviții cu structură apropiată sînt recunoscuți și eventual transportați prin același transportor, se va observa o inhibiție a transportului unui solvit în prezența altui solvit. În mod corespunzător se va modifica și cinetica transportului, asemănător cu cea a reacțiilor enzimatice în prezența unui inhibitor competitiv.

A doua etapă, mai neclară, ca mecanism molecular constă în traversarea membranei de către solvit, denumită uneori și translocare (41). Pentru această etapă a transportului au fost imaginate mai multe modele, dar cel mai popular în prezent constă în descrierea transportorului ca o proteină transmembranară care suferă modificări conformaționale reversibile. Mecanismul este denumit de „ping-pong" (fig. 6).

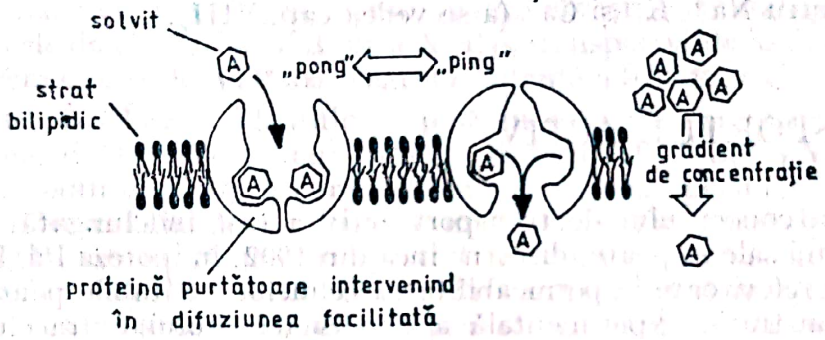


Fig. IV. 6 — Reprezentarea foarte schematică a modului în care o modificare de conformație a unei proteine purtătoare ar putea interveni în difuziunea facilitată a unui solvit fără sarcină electrică A. Proteina poate exista în două stări conformaționale diferite. În stare „ping" situsurile de legătură pentru A sînt expuse la exteriorul stratului bilipidic. Dimpotrivă, în stare „ping" aceleași situsuri sînt întoarse spre fața opusă a stratului dublu lipidic. Cu toate că acest proces este totalmente reversibil, în cazul cînd concentrația solvitului A este mai crescută la exterior, se va fixa o mai mare cantitate din substanța A la proteina purtătoare. Consecința va consta într-un transport net al substanței A în sensul gradientului de concentrație (După B. Alberts și colab., 1986) (1).

2.3. Difuziunea simplă mediată de proteine canal

Existena canalelor ionice, îndeosebi la nivelul plasmalemei celulelor excitabile, reprezintă o problemă esențială în clarificarea mecanismelor de transport prin membrană. O serie de date referitoare la canalele ionice sînt prezentate în capitolul VIII. În principiu, deși canalele mediază, adică „facilitează" trecerea unor substanțe, difuziunea simplă produsă prin canale se deosebește prin cinetica sa de difuziunea facilitată. Astfel, viteza transportului poate fi mai mare decît în cazul difuziunii facilitate (probabil deoarece nu există restricții de saturare identice cu saturarea proteinelor transportor) și transportul nu se saturează, deci, nu există V_{max} (fig. 5).

Scanned with OKEN Scanner

Permeabilitatea selectivă a membranelor pentru ionii mici are o importanță extremă într-o serie de activități celulare esențiale ca: generarea impulsurilor electrice în celulele nervoase și musculare (a se vedea cap. VIII), eliberarea neurotransmițătorilor și a neuromediatorilor, transducția senzorială și transportul la nivelul epiteliilor. Deoarece schimbul de energie implicat în mișcarea unor ioni ca Na^+ și K^+ din mediul apos către interiorul nepolar al barierei lipidice este enorm, de ordinul 60 kcal/mol, la nivelul membranei celulare s-au dezvoltat structuri specializate care reduc energia necesară trecerii ionilor prin plasmalemă (33). Canalele ionice, reduc considerabil bariera energetică menționată prin realizarea la nivelul stratului bilipidic a unor căi polare apoase. Canalele ionice sînt proteine și prezintă o serie de caracteristici comparabile cu cele ale enzimelor: energia redusă de tranziție pentru mișcările ionilor de pe o față a membranei la cealaltă; transportul prin canale se saturează o dată cu creșterea concentrației substratului (ion), canalele sînt specifice pentru un anumit ion și pot fi inhibate competitiv (blocate).

Proprietățile canalelor ionice sînt influențate de cîmpul electric al membranei. Bibliografia referitoare la proprietățile diferitelor tipuri de canale ionice este impresionantă. Dintre canalele caracterizate amănunțit, enumerăm cele pentru Na^+, K^+ și Ca^+ (a se vedea cap. VIII).

3. TRANSPORTUL ACTIV

Geneza conceptului de transport activ a fost îndelungată. Germenele ideii existenței sale se poate discerne încă din 1902, în ipoteza lui J. Bernstein (citat de 20) referitoare la permeabilitatea celulelor excitabile pentru potasiu. Prima demonstrație experimentală a expulsiei sodiului extracelular a fost realizată în 1940, de H.B. Steinbach. Curînd R.B. Dean (citat de 20) a susținut că expulsia de sodiu este determinată de un mecanism acompaniat de un consum de energie. El a introdus, pentru a sugera efectuarea unui „lucru metabolic", denumirea de pompă de sodiu, pentru ca în 1954 J. Rosenberg (citat de 20) să delimiteze clar conceptul de transport activ. Un moment important este anul 1957, cînd J.C. Skou, utilizînd datele acumulate, postulează ca bază enzimatică pentru transportul activ (Na^+, K^+) ATP-aza (44, 45, 46). Ulterior, s-a demonstrat că această enzimă este o glicoproteină membranară care reprezintă însăși pompa de sodiu și potasiu.

Concomitent a devenit clară existența la nivelul celulelor și a altor „pompe active", pe lîngă faptul că însuși procesul de transport activ se produce uneori prin mecanisme sensibil diferite în ceea ce privește secvențele moleculare determinante. Astfel încît în prezent sînt descrise mai multe clase distincte de transport activ.

3.1. Tipuri de transport activ

Transportul activ, producîndu-se împotriva gradienților de potențial electrochimic, necesită energie și deci trebuie să fie cuplat strîns la o reacție exoenergetică. Cuplarea se poate realiza direct sau indirect, deosebindu-se astfel o clasă de *transporturi active primare* și, respectiv, *secundare*.

Scanned with OKEN Scanner

Transportul activ primar este cuplat direct la o reacție exoenergetică, constînd cel mai frecvent din hidroliza legăturilor fosfat bogate în energie ale ATP. Diferențele de potențial electrochimic, rezultate consecutiv transportului activ primar, pot reprezenta baza producerii transportului activ secundar. Astfel, un anumit solvit poate fi transportat cuplat la difuziunea facilitată a altui solvit, care trece deci prin membrană în sensul gradientului său electrochimic. Deoarece solvitul secund este cel mai adesea un ion a cărui diferență de potențial electrochimic a fost creată printr-un transport activ primar, procesul a fost denumit transport activ secundar.

De dată recentă s-a conturat, în afara acestor două clase distincte, un mecanism particular de transport activ, denumit translocație de grup, în cadrul căruia are loc o modificare biochimică a solvitului transportat.

3.2. Transportul activ primar

Numeroși ioni sînt transportați printr-un mecanism de transport activ primar, cuplat la o reacție exoenergetică a cărei sursă de energie este ATP. În cadrul reacției o ATP-ază membranară servește ca intermediar comun, catalizînd cele două procese, hidroliza ATP și transportul de ioni. În continuare vom enumera o serie de ATP-aze a căror existență a fost atestată experimental.

Printre ATP-azele identificate pînă în prezent, care corespund la tot atîtea forme de transport activ primar sînt: a) *ATP-aza* (Na^+, K^+), sau pompa de sodiu și potasiu, prezentă în membrana plasmatică aproape a tuturor celulelor animale și chiar la unele alge. Transportul corespunzînd acestei ATP-aze constă în „pomparea" Na^+ din celulă la exterior și a K^+ de la exterior spre interiorul celulei. Procesul are o deosebită importanță fiziologică și este foarte semnificativ faptul că mai mult de o treime din ATP-ul consumat de un animal în repaus este utilizat pentru pomparea acestor ioni. Mai mult, în cazul neuronilor, după depolarizarea consecutivă excitației, pînă la 70% din necesarul de energie al celulei este utilizată de pompa de Na^+/K^+ pentru refacerea potențialului de membrană (repolarizare). ATP-aza (Na^+, K^+) prezintă de asemenea o semnificație clinică particulară. De aceea, o vom prezenta mai pe larg. b) *ATP-aza de* Ca^{2+}, prezentă îndeosebi în membranele reticulumului endoplasmic, permite transportul activ de calciu. c) *ATP-aza* (H^+/K^+) a fost identificată la nivelul membranelor celulelor din mucoasa gastrică și permite efluxul de H^+ împreună cu influxul de K^+. d) *ATP-aza de* H^+ sau „pompa protonică" detectată în membranele citoplasmatice ale procariotelor, face posibil transportul de H^+ din interiorul celulei spre exteriorul acesteia; de asemenea o astfel de ATP-ază se află și la nivelul membranelor mitocondriale. În acest caz ATP-aza are un rol fiziologic important, deoarece catalizează o reacție inversă celei catalizate de ATP-azele menționate anterior și anume, fosforilarea ADP în ATP. ATP-azele care servesc la sinteza ATP se mai numesc și *ATP-sintetaze*. Reacția de sinteză a ATP este puternic endoenergetică. În condiții fiziologice ea este acompaniată de o creștere a energiei libere (Gibbs) de ordinul 40 KJ pe mol de ATP sintetizat. De aceea, reacția nu poate fi spontană și trebuie cuplată cu o reacție exoenergetică produsă la nivelul membranei. Reacția exoenergetică constă dintr-un transfer de electroni de la forma redusă a unui prim cuplu redox la forma oxidată a unui cuplu redox cu potențial de electrod mai ridicat. Această

Scanned with OKEN Scanner

reacție este catalizată de un ansamblu de enzime și coenzime de oxidoreducere de la nivelul membranei. Natura lanțului de electroni depinde de natura membranei. Subiect de numeroase controverse, mecanismul de cuplaj între transferul de electroni și sinteza ATP a fost descris într-o alternativă, larg acceptată în prezent, de către P. Mitchell. El propune un *cuplaj chemiosmotic*. Într-o primă etapă, transferul de electroni de-a lungul lanțului de sinteză este cuplat cu un transport activ de protoni, producîndu-se astfel o diferență de potențial electrochimic al protonilor de o parte și de alta a membranei. În acest sens, lanțul de transportori de electroni este o pompă de protoni. Într-o a doua etapă, difuziunea protonilor prin intermediul ATP-sintetazei în sens exoenergetic este cuplată la sinteza de ATP. Mecanismul, cu excepția unor detalii, este identic indiferent de natura membranei. Rezultă că în cuplajul chemiosmotic intermediarul comun între transferul de electroni și sinteza de ATP este diferența de potențial electrochimic a protonilor (37, 41).

d) *La bacteriile gram negative* unele substraturi organice sînt transportate printr-un mecanism de transport activ, cuplat la hidroliza ATP.

e) Un caz particular îl constituie bacteria *Halobacterium halobium*, la care prin intermediul proteinei membranare bacteriodopsină se folosește energia luminoasă pentru pomparea H^+.

În continuare ne vom referi la cea mai importantă pompă activă, ATP-aza (Na^+, K^+) și, mai succint, la pompa de Ca^{2+}.

3.2.1. *ATP-aza (Na^+, K^+)*

Pompa de sodiu și potasiu reprezintă, datorită importanței fiziologice și semnificației sale clinice, un subiect demn de o monografie.

3.2.1.1. *Structură moleculară și mecanismul de funcționare*

Pasul decisiv în cunoașterea pompei de Na^+ și K^+ a fost realizat în 1957, cînd s-a descoperit că activitatea optimă a unei enzime care hidrolizează ATP în ADP și fosfat anorganic necesită prezența de Na^+ și K^+. Enzima a fost denumită (Na^+, K^+) ATP-ază. În stabilirea relației dintre enzimă și pompa de Na^+ — K^+ s-a dovedit deosebit de utilă acțiunea inhibitoare a glicozidelor cardiotonice, digitală și îndeosebi ouabaïna. Proba decisivă că energia servind la antrenarea pompei este furnizată prin hidroliza ATP a fost obținută pe fantomele eritrocitare reconstituite (a se vedea cap. VII).

După numeroase experimente s-a ajuns la concluzia că pompa de Na^+ și K^+ este reprezentată de însăși ATP-aza (Na^+, K^+), obținîndu-se de asemenea date care stau la baza modelului actual al ATP-azei: 1) transportul de Na^+ și K^+ este strîns cuplat cu hidroliza ATP; 2) transportul ionic și hidroliza ATP nu se produc decît dacă ionii de Na^+ și ATP sînt prezenți în interiorul celulelor (fantome), iar ionii de K^+ la exterior; 3) ouabaïna are efect inhibitor numai cînd se află în exteriorul celulei, unde intră în competiție cu locurile de legătură pentru K^+; 4) pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată se pompează la exterior 3 Na^+ și la interior 2 K^+, fiecare moleculă de ATP-ază hidrolizînd 100 molecule de ATP pe secundă (1).

Date mai recente atestă că legarea ionilor de Na^+ în interiorul celulei este absolută, dar la nivelul locurilor de legare pentru K^+ se mai pot lega și alți ioni, cu următoarea secvență de afinitate $K > Rb > NH_4 > Cs > Li$. În plus, ionii

Scanned with OKEN Scanner

de litiu pot fi transportați în interiorul sau la exteriorul celulei, asemenea ionilor de sodiu. În afara inhibitorilor glicozidici standard, au mai fost detectați cu acest efect inhibitorii grupărilor sulfhidril (clorpromazina, acidul etacrinic, N-entilmaleimida etc.), oligomicina și vanadiul (53).

Un alt moment important a fost izolarea și purificarea ATP-azei (Na^+, K^+) de la nivelul celulelor renale, dotate cu cel mai mare număr de pompe ATP-azice (23, 24). Au fost obținute astfel o serie de date structurale precise: ATP-aza este compusă dintr-o subunitate mare catalitică (α), de 100 000 daltoni și o glicoproteină asociată (β), de 100 000 daltoni. Cele două subunități ar fi reunite sub forma unui tetramer, ca în modelul reprezentat în fig. 7. Masa totală a (Na^+, K^+) ATP-azei ar putea fi de 300 000 daltoni (fig. 8). Cel mai frecvent, transportul de Na^+ prezintă o importanță mai mare decît transportul de K^+. De aceea, pompa de Na^+—K^+ mai este denumită și pompă de sodiu.

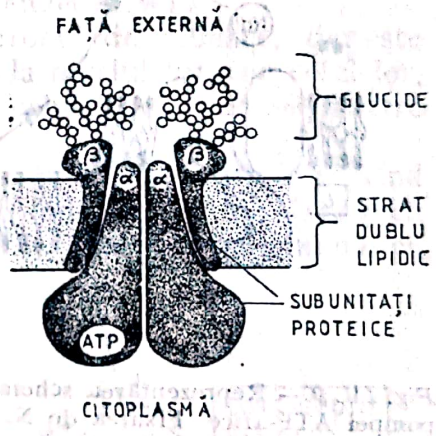


Fig. IV. 7 — Un model posibil (Na^+, K^+) ATP-azei. Fiecare unitate funcțională a enzimei-pompă este alcătuită din două subunități mari (α) care străbat membrana și două subunități mici glicoproteicè (β) care sînt expuse spre exteriorul celulei. Fiecare unitate funcțională prezintă un loc de legare pentru glicozizi cardiaci, un situs de fosforilare, trei locuri de legare pentru sodiu și două locuri de legare pentru potasiu. Este însă dificil de explicat cum un tetramer aparent simetric poate prezenta un număr impar de situsuri pentru legare. O posibilitate ar consta în formarea locurilor de legare la interfața subunităților. Altă ipoteză susține că subunitățile sînt diferite, au conformații complementare, astfel încît, cînd se schimbă conformația unei jumătăți se modifică și cealaltă, reciproc, în așa fel încît conformația secundă este imaginea în oglindă a primei. După K. J. Sweadner și S. M. Goldin, 1980) (50).

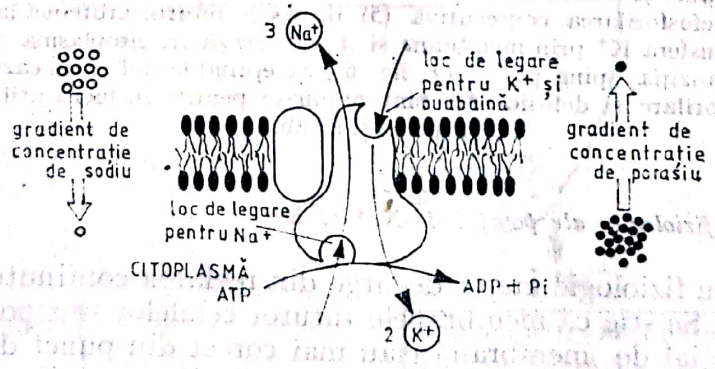


Fig. IV. 8 — Schemă derivată din modelul conținut în fig. 7, reprezentînd ATP-aza (N^+, K^+) pompînd activ N^+ spre exterior și K^+ în interiorul celulei, împotriva gradienților de concentrație ale acestora. De notat că potasiul și ouabaïna intră în competiție pentru același loc de legare, situat pe fața expusă extern a tetramerului APT-azic. Pe figură acesta este reprezentat simplificat, sub forma unui dimer.

Scanned with OKEN Scanner

Cu toată abundența de rezultate, mecanismul molecular de funcționare a (Na^+, K^+) ATP-azei nu este încă explicat pe deplin (29). În general se acceptă producerea transportului prin modificări comparabile cu mecanismul de „ping-pong" descris la difuziunea facilitată, cu mențiunea că în cazul pompei ATP-azice modificările rezultă dintr-un ciclu de fosforilare prin ATP și defosforilare (fig. 9).

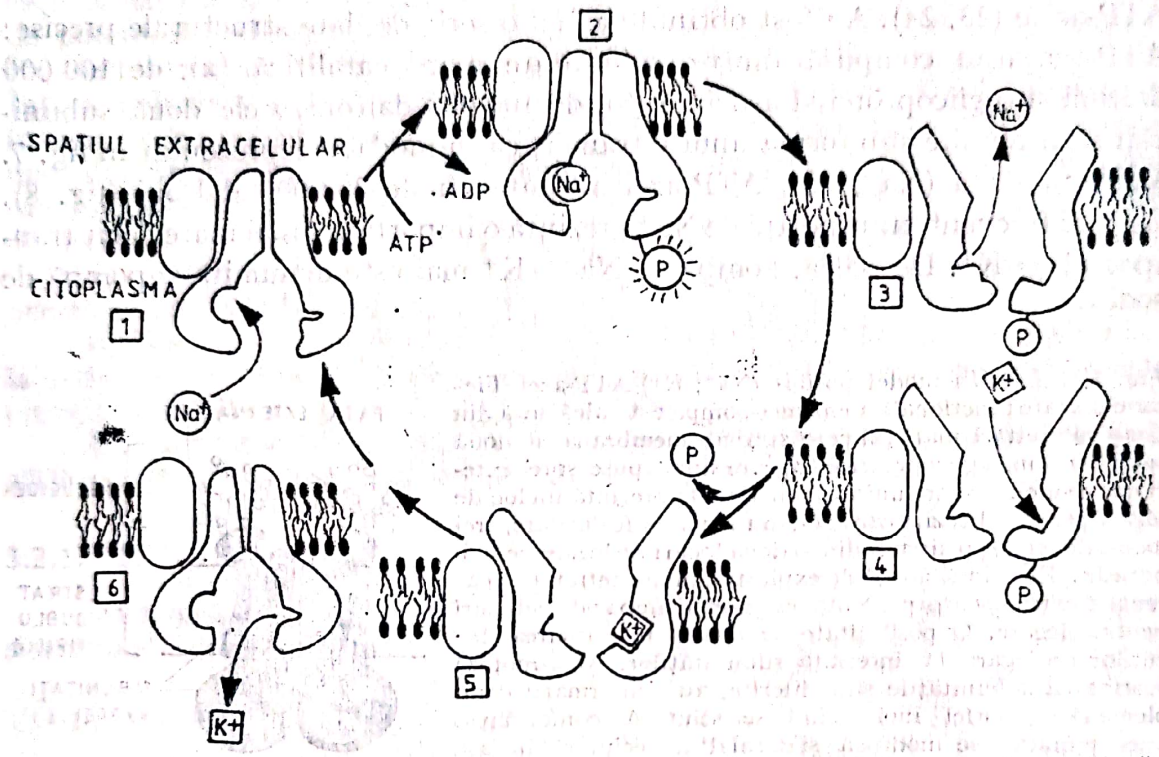


Fig. IV. 9 — Reprezentarea schematică a modelului, larg acceptat în prezent, funcționării pompei ATP-azice. Fixarea de Na^+ (1) și fosforilarea consecutivă (2) la nivelul feței citoplasmatice a ATP-azei induce o modificare conformațională a proteinei, care transferă Na^+ la nivelul membranei și îl eliberează la exterior (3). Apoi fixarea K^+ pe fața externă a proteinei-pompă (4), și defosforilarea consecutivă (5) provoacă returul proteinei la conformația sa de origine, care transferă K^+ prin membrana și îl eliberează în citoplasmă (6). Se poate stabili o analogie cu tranziția „ping pong" (v. fig. 6), exceptînd faptul că în cazul pompei tranzițiile induse prin fosforilare și defosforilare sînt ordonate pentru un lucru util proteinei (După B. Alberts și colab.) (1).

3.2.1.2. *Rolurile fiziologice ale pompei de Na^+ și K^+*

Rolul său fiziologic major decurge din reglarea conținutului intracelular de Na^+ și K^+. Se știe că membranele tuturor celulelor sînt polarizate, prezentînd un potențial de membrană (sau mai corect din punct de vedere fizic, o diferență de potențial) cu valori între —20 mV și —200 mV (cel mai frecvent între —60 mV și —90 mV) în funcție de tipul celular și de specie (a se vedea și cap. VIII). Ca o expresie a acestui fapt, fața citoplasmatică a plasmalemei este încărcată electric negativ iar cea externă pozitiv. Menținerea potențialului de membrană se realizează prin rolul fundamental a două proteine de transport. Prima este pompa de Na^+ și K^+, iar a doua canalul de pierdere (fugă) al K^+, care permite difuziunea pasivă a cationului din celulă spre exterior, adică în

Scanned with OKEN Scanner

sensul gradientului său de concentrație. Se știe că intracelular K^+ este mult mai concentrat (aproximativ 400 mM) față de mediul extracelular (20 mM). Dimpotrivă, Na^+ prezintă o concentrație intracelulară mult mai mică (50 mM) față de cea extracelulară (440 mM) (datele se referă la axon, după ref. 1). Ca urmare, K^+ are tendința să se „scurgă" pasiv prin canalul de pierdere, prin aceasta interiorul celulei devenind și mai electronegativ. De aceea, la o anumită valoare a potențialului de membrană (—75 mV pentru axon tendința K^+ de a ieși din celulă pe baza gradientului său de concentrație este compensată prin tendința K^+ de a intra în celulă datorită gradientului electric (potențial de membrană). În acest punct de echilibru, gradientul electrochimic pentru K^+ dispare și nu există nici o mișcare netă de K^+: numărul de ioni de K^+ care intră în celulă este egal cu numărul ionilor ce ies din celulă. Canalul de pierdere a K^+ este, însă, ușor permeabil și la Na^+. De aceea, o anumită cantitate de Na^+ se infiltrează lent în celulă, în sensul gradientului său de concentrație. Afluxul net de Na^+ crește numărul de sarcini pozitive din interiorul celulei, ceea ce permite ieșirea altor ioni de K^+. Prin repetarea acestor procese s-ar putea ajunge la egalarea concentrațiilor de Na^+ și K^+, dacă nu ar exista pompa de Na^+ și K^+ care menține gradiente de concentrație ale Na^+ și K^+, pompînd ionii de Na^+ la exterior și cei de K^+ în interiorul celulei (1,30).

Mecanismul prezentat a fost descris la neuronul de calmare, dar este prezent în reglarea potențialului de membrană de la nivelul tuturor celulelor, după principii asemănătoare. Excepție fac doar celulele canceroase Lettré (fig. 10).

Rolul ATP-azei în cazul potențialului de membrană este în primul rînd de reglare prin mecanismul descris. Prin asimetria ionică indusă de faptul că pompa transportă la exterior 3 Na^+ și la interior 2 K^+ ea contribuie numai cu

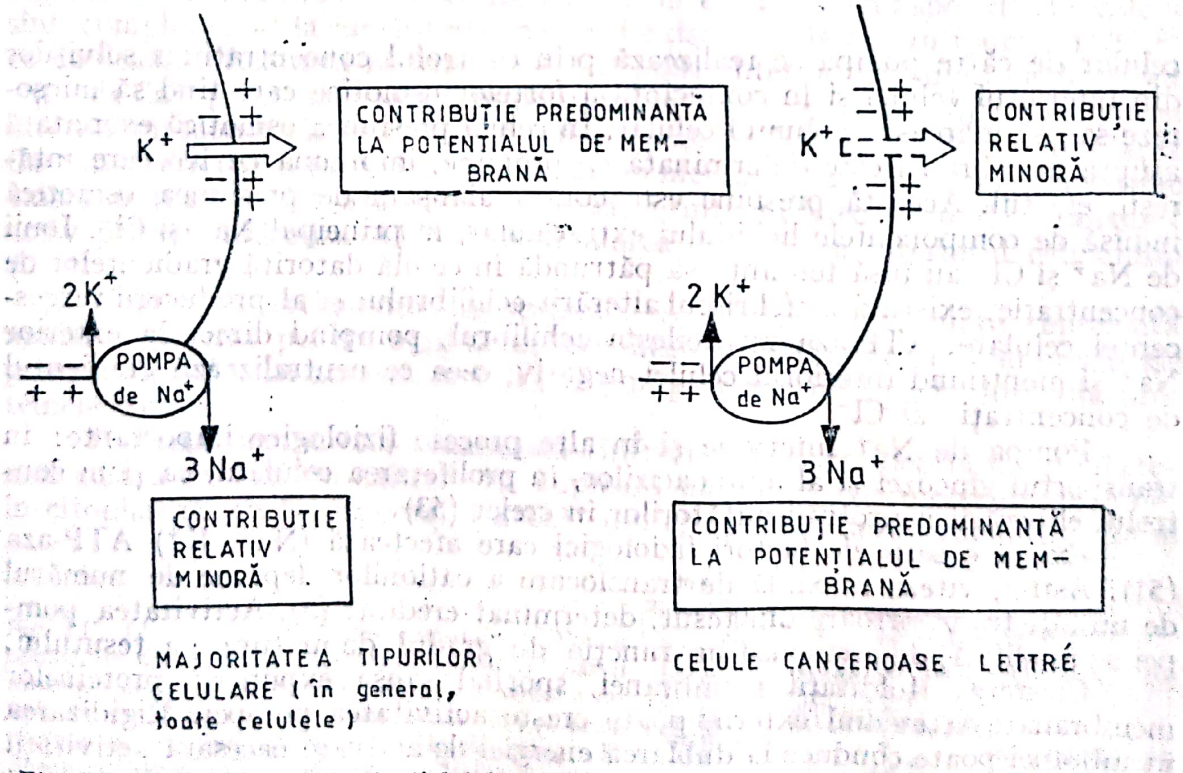


Fig. IV. 10 — Generarea potențialului de membrană și o excepție: celulele canceroase Lettré.

Scanned with OKEN Scanner

20% la potențialul de membrană. Majoritatea de circa 80% a acestui potențial se datorează gradientelor de Na^+ și K^+ menținute prin (Na^+, K^+) ATP-ază, combinate cu permeabilitatea mai mare a plasmalemei pentru K^+ decît pentru Na^+ sau anioni (1,4).

În menținerea potențialului de membrană pot interveni și alți ioni, în funcție de permeabilitatea membranei plasmatice. De exemplu, plasmalemele a numeroase celule sînt permeabile pentru Cl^-, care deci va contribui într-o manieră importantă la menținerea potențialului de membrană.

În condiții de restricție a energiei metabolice, care împiedică funcționarea normală a pompei de Na^+ și K^+ se constată că concentrațiile celor doi cationi devin egale. În plus, prin inhibiția temporară a energiei metabolice, celula devine turgescentă, ceea ce demonstrează un alt rol important al ATP-azei (Na^+, K^+), de control al volumului celular (fig. 11). Reglarea volumului

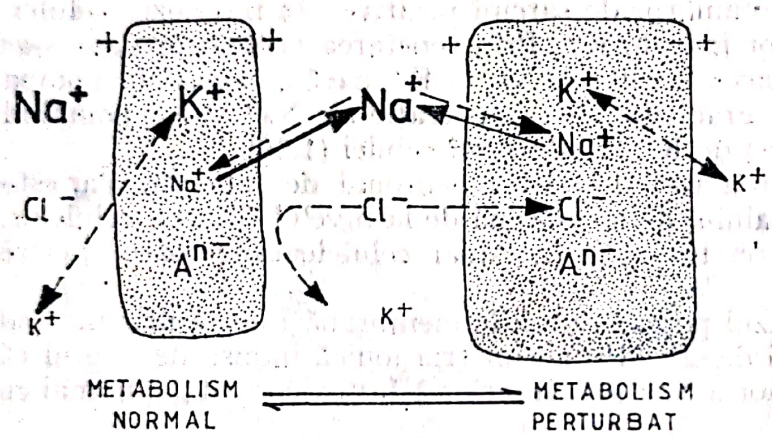


Fig. IV. 11 — Reprezentarea schematică a celulei normale (stînga) și a celulei turgescente (dreapta), rezultată din inhibiția temporară a energiei metabolice. Modificările sînt reversibile (După A. D. C. Macknight și A. Leaf, 1986) (30).

celular de către pompă se realizează prin controlul concentrațiilor solviților din interiorul celulei și în consecință a forțelor osmotice care tind să micșoreze sau să mărească volumul celular. În celulă presiunea osmotică exercitată asupra membranei este determinată de proteine, împreună cu K^+ care întărește efectul. Această presiune este contrabalansată de presiunea osmotică indusă de componentele lichidului extracelular, în principal Na^+ și Cl^-. Ionii de Na^+ și Cl^- au însă tendința să pătrundă în celulă datorită gradientelor de concentrație, existînd astfel riscul alterării echilibrului și al producerii turgescenței celulare. ATP-aza restabilește echilibrul, pompînd direct la exterior Na^+ și menținînd interiorul celulei negativ, ceea ce neutralizează gradientul de concentrație al Cl^-.

Pompa de Na^+ intervine și în alte procese fiziologice importante: în transportul glucozei și al aminoacizilor, în proliferarea celulară, ca și în controlul eliberării neurotransmițătorilor în creier (53).

Există o serie de factori fiziologici care afectează (Na^+, K^+) ATP-aza (51). Astfel, viteza maximă de translocare a cationilor depinde de numărul de unități transportoare din țesut, determinat ereditar (5). Activitatea pompei se modifică, de asemenea în funcție de gradul de maturare a țesutului.

Creșterea fluidității membranei, sporind șansa expunerii proteinelor membranare la mediul extern, poate crește activitatea pompei. Rigidizarea membranei poate conduce la dublarea energiei de activare necesară activității enzimei (51).

Scanned with OKEN Scanner

Într-o serie de țesuturi, concentrația AMP ciclic exercită un efect asupra ATP-azei, dar sensul modificărilor variază în funcție de țesutul considerat. Astfel, la nivelul ficatului se produce o stimulare, iar la nivelul mușchiului striat de șobolan o inhibiție (10).

Acțiunea hormonilor este uneori foarte pronunțată. De exemplu, activitatea ATP-azei (Na^+, K^+) renale este crescută cu mai mult de 45% de către triiodotironină, iar aldosteronul controlează sinteza de noi proteine enzimatice. Insulina produce o retenție a K^+ în mușchi, probabil, prin creșterea ratei de reînînoire a ATP-azei (10). Efecte asemănătoare prezintă și catecolaminele. Factorul natriuretic este considerat o moleculă endogenă cu un comportament asemănător ouabaïnei și deci inhibă pompa de sodiu și potasiu. Există încă alte numeroase date, care confirmă relațiile fiziologice complexe ale (Na^+, K^+) ATP-azei (53).

În acord cu rolul său fiziologic, ATP-aza prezintă și largi implicații în patologie schițate în capitolul VII, existînd de asemenea unele referiri și în alte capitole.

3.2.2. *(Ca^{2+})ATP-aza*

Ionii de calciu reprezintă, prin trecerea lor în cantitate redusă, de la suprafața celulei în interiorul acesteia, un semnal major cu rang de mesager secund (7).

Concentrația de Ca^{2+} liber în citoplasmă (10^{-7}M) este foarte redusă în raport cu cea a Ca^{2+} extracelular (10^{-3}M). Pentru menținerea acestei diferențe de concentrație concură mai multe mecanisme de transport activ. Rezultă, în esență, fie un eflux activ în afara celulei, fie acumularea activă în interiorul organitelor intracelulare. Mecanismele ce intervin în transportul de calciu sînt complexe: a) la nivelul plasmalemei există un sistem antiport Na^+/Ca^{2+} ce cuplează difuziunea facilitată de Na^+ (spre interiorul celulei) cu un eflux activ de Ca^{2+} printr-un mecanism de transport activ secundar; b) în membrana internă mitocondrială se află un sistem uniport de Ca^{2+}, producînd acumularea Ca^{2+} în interiorul mitocondriei; c) în fine, în membrana reticulului endoplasmic există o (Ca^{2+}) ATP-ază care cuplează, printr-un mecanism de transport activ primar, hidroliza ATP cu acumularea de Ca^{2+} în interiorul reticulului (7, 41).

Membrana reticulului endoplasmic al celulelor musculare reprezintă modelul preferat pentru studiul proprietăților funcționale și structurale ale pompei de Ca^{2+}. În această membrană pompa reprezintă peste 70% din proteinele totale.

Proteina pompă este constituită dintr-un singur polipeptid cu greutatea moleculară de 115.000 daltoni. Ea cuplează hidroliza unei molecule de ATP, în citoplasmă, cu transportul a 2 Ca^{2+} din citoplasmă spre reticulum. Ciclul

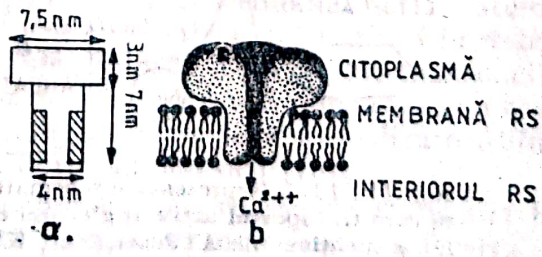


Fig. IV. 12 — a) Forma și dimensiunile ATP-azei pompă de Ca^{2+}; zonele hașurate corespund părții proteinei care stabilește interacțiuni hidrofobe cu lipidele membranare: b) Dispunerea oligomerică posibilă a proteinei în stratul bilipidic (După E. Shechter, 1984, preluat din M. Le Maire și colab., 1981) (41).

Scanned with OKEN Scanner

catalitic este aproape elucidat, constind, ca și în cazul (Na^+, K^+) ATP-azei, dintr-o fosforilare și două stări conformaționale ale proteinei. Forma și dimensiunile proteinei au fost determinate prin difracție cu raze X și microscopie electronică (criofractură). După cum se observă în figura 12 forma este asimetrică, cea mai mare parte a proteinei fiind în contact cu citoplasma. A fost postulată o structură trimerică (fig. 12 b).

3.3. Transportul activ secundar

Fenomenele de transport activ primar descrise anterior (cu excepția celui bazat pe proteine cu afinitate) conduc la formarea unei diferențe de potențial electrochimic. Acest fenomen poate reprezenta baza transportului activ a numeroși solviți: glucide, aminoacizi, alți ioni.

Cuplajul între ionul transport și transportul activ al unui solvit se numește *„port"*. Dacă transportul ionului și solvitului se face în același sens, fenomenul este denumit *simport* sau *cotransport*, iar dacă ionul se deplasează într-o direcție, iar solventul transportat în direcția opusă, sistemul este *antiport* sau *contratransport*. Transportul poate fi electroneutru sau electrogenic. El este electroneutru, dacă transportul solventului prin intermediul transportului se efectuează fără transport net de sarcină și electrogen în cazul contrar.

Mecanismele care permit explicarea transportului activ secundar postulează că ionul motor și solvitul se fixează pe două situsuri distincte ale transportorului pentru a forma un complex ternar.

Exemple de transport activ secundar:

a) *Glucoza* pătrunde în numeroase celule animale datorită pătrunderii simultane a ionilor de Na^+, transportul său nefiind cuplat direct la hidroliza ATP, ci la fluxul ionului de Na^+, în sensul gradientului său electrochimic. Ionul de Na și glucoza se leagă la o proteină de transport specific și pătrund împreună în celulă. Ionii de Na pătrunși în celulă concomitent cu moleculele de glucoză, printr-un fenomen de simport, sînt apoi pompați spre exteriorul celulei de către (Na^+—K^+)-ATP-ază. Viteza de penetrare și cantitatea de glucoză transportată depind de gradientul de concentrație a ionilor de Na la nivelul membranei (fig. 13).

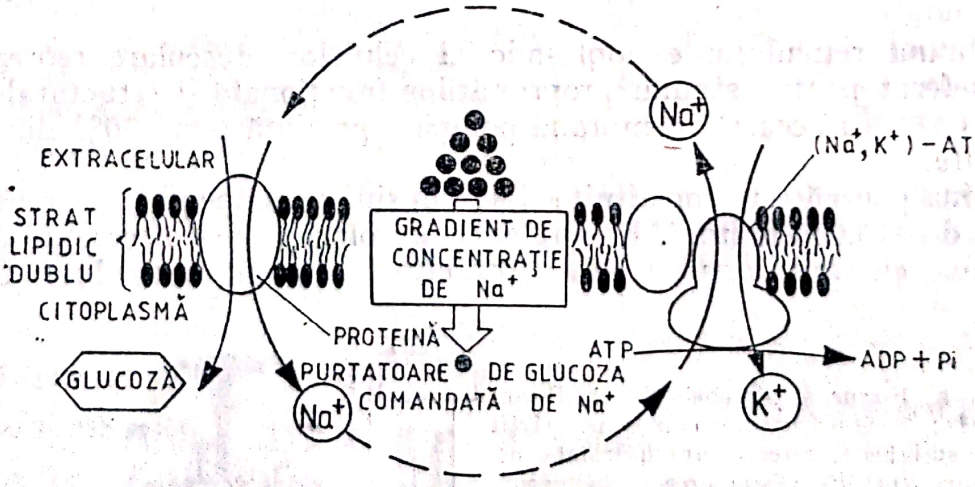


Fig. IV. 13 — Reprezentare schematică a simportului de glucoză, indicînd modul în care transportul activ al glucozei este comandat de un gradient de Na^+ angajat și menținut de ATP-aza (Na^+, K^+) (După B. Alberts și colab., 1986) (1)

Scanned with OKEN Scanner

Simporturile activate de către ionii de Na sînt în mod curent utilizate de către celulele animale în scopul acumulării aminoacizilor. Unele celule, ca acelea ale microvilozităților intestinale, sînt de asemenea bogate în simporturi responsabile de transportul activ al ozelor (fig. 14). Celulele intestinului subțire conțin un simport Na^+ specializat în transportul ionilor de Cl. Ionii de sodiu reprezintă, de asemenea, forța motrice a sistemelor antiport care resping ionii de calciu din citosolul a numeroase celule. Cea mai mare parte dintre simporturile și antiporturile celulelor animale sînt cuplate la gradienți de Na^+ creați de $(Na^+—K^+)$-ATP-ază.

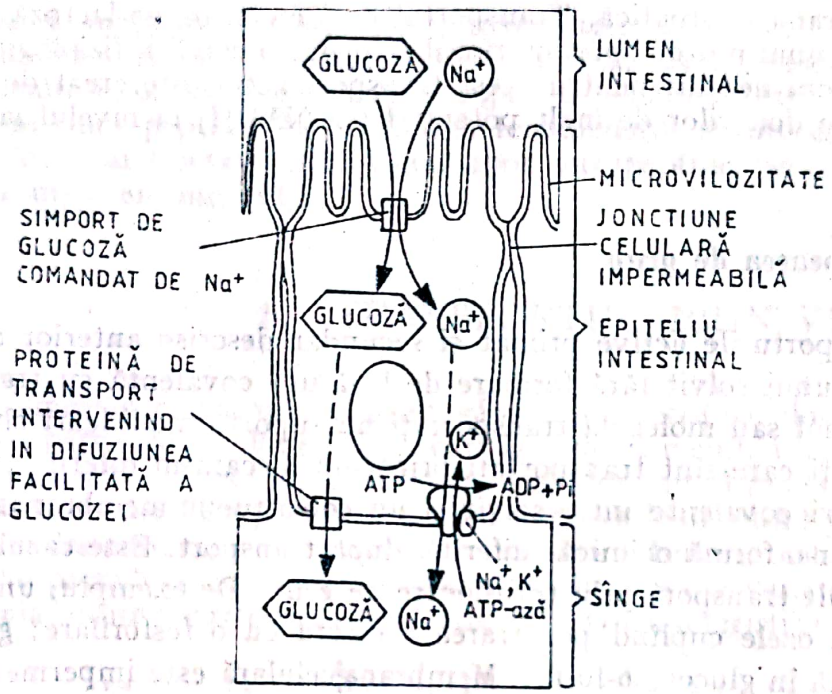


Fig. IV. 14 — Distribuția asimetrică a proteinelor de transport într-o celulă epitelială intestinală conduce la transportul transcelular de glucoză pornind de la cavitatea (lumenul) intestinală pînă la nivelul sîngelui. Glucoza este pompată din intestin (partea de sus a schemei) prin membrană printr-un simport cu Na^+. Apoi glucoza iese din celulă, în sensul gradientului său de concentrație, prin difuziune facilitată, ori prin intermediul unei alte proteine de transfer a glucozei, situată în membrana plasmatică bazală și laterală. Gradientul de Na^+ care comandă simportul de glucoză este menținut de ATP-aza (Na^+, K^+) situată în membrană plasmatică bazală și laterală, care menține concentrația intracelulară de Na^+ la un nivel scăzut.

b) *Transportul aminoacizilor* se produce prin intermediul unor sisteme simport cu Na^+. Datele experimentale atestă existența a cel puțin 5 proteine diferite la nivelul membranei plasmatice, specializate pe grupe de aminoacizi înrudiți structural (9). Gama fenomenelor de transport activ de acest gen este mult mai largă. Există, de exemplu, sisteme de transport specializate (difuziune facilitată și transport activ) pentru hormonii steroizi (16).

c) *Fluxul de protoni* este cuplat la numeroase procese de transport la bacterii. Sistemele simport și antiport sînt „mașinării moleculare" ancestrale.

Scanned with OKEN Scanner

Aceasta o probează faptul că sistemele de transport bacteriene sînt cuplate cu fluxuri membranare de protoni. Un exemplu: bacteria Escherichia coli, „locuitor" obișnuit al porțiunii terminale din tractul intestinal de mamifere, a elaborat un mecanism foarte eficient de concentrare a lactozei (41).

Pompa pentru acest dizaharid este un simplu lanț polipeptidic de 30 kdal denumit lactoză — permează sau proteină M. S-a demonstrat că un potențial de membrană creat de un gradient de ioni de K poate avea, de asemenea, ca efect, pomparea lactozei. Pe de altă parte, un gradient de pH impus, cu mediul exterior acid, conduce la acumularea de lactoză. Aceste experiențe dovedesc că forța motrice pentru transportul activ de lactoză este forța proton-motrice prin membrana plasmatică. Transportul unei molecule de lactoză este cuplat la mișcarea unui proton spre interiorul celulei. În condiții fiziologice, gradientul de protoni necesar pentru acest transport activ este creat de fluxuri de electroni ale donorilor de înalt potențial (ca NADH) la nivelul lanțului respirator.

3.4. Translocarea de grup

Transporturile active primar și secundar descrise anterior au ca efect deplasarea unui solvit fără formare de legătură covalentă cu transportorul. În plus, ionul sau molecula transportați nu suportă modificări chimice. Ori, există solviți care sînt transportați printr-un mecanism diferit: cu formarea unei legături covalente între solvit și un constituent membranar și care se regăsesc într-o formă chimică diferită după transport. Este cazul unui fenomen denumit transport prin translocare de grup. De exemplu, unele bacterii acumulează ozele cuplînd penetrarea acestora cu o fosforilare: glucoza este transformată în glucoza-6-fosfat. Membrana celulară este impermeabilă ozelor fosforilate, astfel încît acestea se acumulează în interiorul bacteriei (fig. 15).

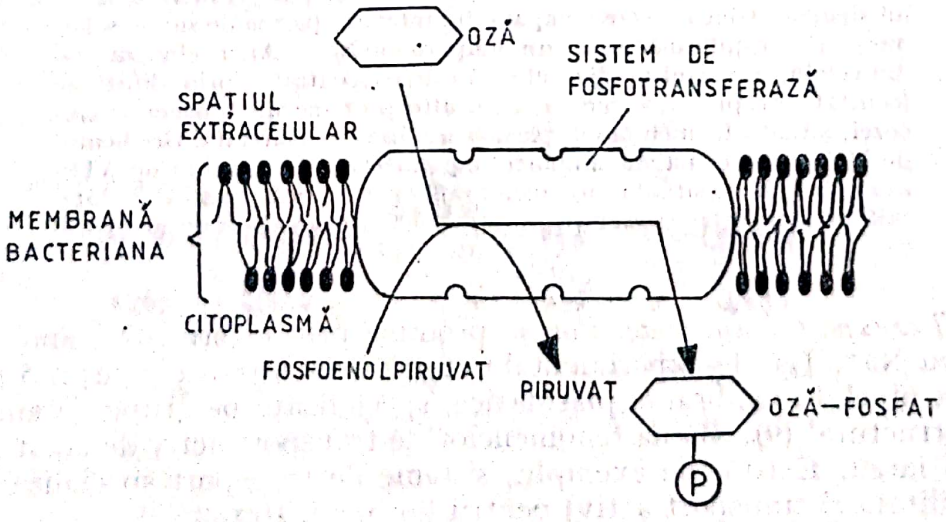


Fig. IV. 15 — Translocarea de grup prin sistemul fosfotransferazei din membrana bacteriilor (După B. Alberts și colab., 1986) (1).

4. TRANSPORTUL DIRECT AL MACROMOLECULELOR

Datele referitoare la transportul direct prin plasmalemă a unor macromolecule sînt puține. De exemplu, la unele bacterii în cursul procesului de transformare genetică moleculele de ADN traversează atît peretele celular cît și membrana plasmatică a procariotelor. La eucariote acest proces este limitat la următoarele situații: a) în mod normal proteinele, pe măsura sintezei lor, trec direct prin membrana reticulului endoplasmic; b) în cazuri patologice, o serie de toxine bacteriene traversează plasmalema, exprimîndu-și efectele toxice în citosol (1).

În marea majoritate a cazurilor, macromoleculele sînt transportate prin intermediul veziculelor. Totuși, într-o serie de lucrări recente au fost publicate rezultate, obținute pe animale, legate de eventualitatea unui transport direct al unor peptide. În explicarea fenomenului se invocă structura moleculară, cel mai frecvent fiind cazul unor tetrapeptide, sau intervenția localizată a unor enzime (42).

5. TRANSPORTUL PRIN VEZICULE

Mecanismele care permit celulelor să absoarbă sau să elimine macromolecule sau particule de dimensiuni mari la nivelul membranei plasmatice sînt complet diferite de cele ale transportului ionilor sau al moleculelor mici. Transportul se va produce prin intermediul unor vezicule, fiind posibile trei procese: 1) *endocitoza*, cînd transportul are loc spre interiorul celulei; 2) *exocitoza*, din citoplasmă la exterior și 3) *transcitoza*, în care caz veziculele străbat integral celula, dintr-o parte în cealaltă (fig. 16). O caracteristică importantă

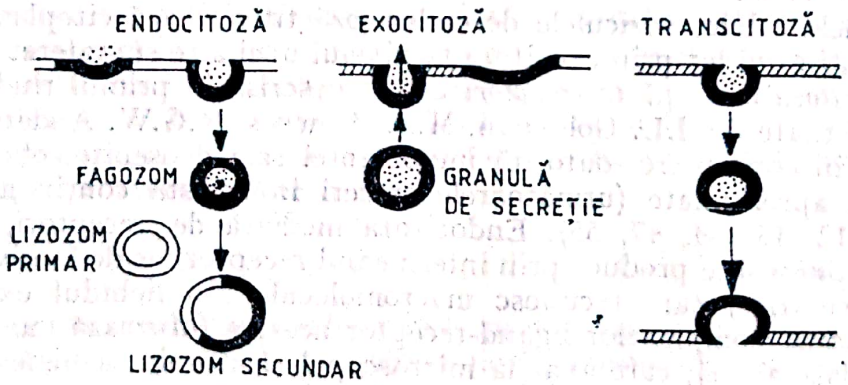


Fig. IV. 16 — Transportul pe calea veziculelor: endocitoza, exocitoza și transcitoza. Schema este simplificată, atît în ceea ce privește etapele de transport, cît și posibilitatea unor alternative în cadrul aceluiași tip de macrotransfer (După Gh. Benga, 1985) (4).

a acestor procese constă în faptul că macromoleculele secretate sau ingerate sînt izolate în interiorul veziculelor și în general nu se amestecă cu alte molecule sau organite ale celulei. Prin mecanisme încă necunoscute, fiecare veziculă nu fuzionează decît cu structuri membranare specifice, ceea ce asigură

Scanned with OKEN Scanner

un transfer ordonat de macromolecule între exteriorul și interiorul celulei. Studiul intensiv al endocitozei și exocitozei virusurilor a condus la obținerea unor rezultate referitoare și la mecanisme.

5.1. Endocitoza

Endocitoza se divide în două tipuri, funcție de natura substanțelor ce pătrund în celulă: pinocitoza și fagocitoza.

5.1.1. *Pinocitoza*

Pinocitoza (de la „pinein"-a bea, în greacă) prezintă două alternative: a) independentă de receptori; b) mediată de receptori, sau adsorbtivă.

Pinocitoza independentă de receptori este denumită și *endocitoză în fază lichidă* sau *constitutivă*, iar în ultimii ani a fost depistată, în mod surprinzător, la cea mai mare parte a celulelor eucariote, ca un proces continuu. Fenomenul poate fi pus ușor în evidență prin introducerea în mediul extracelular a unui trasor opac la electroni și examinarea ulterioară a celulelor la microscopul electronic.

Viteza endocitozei variază de la un tip celular la altul, dar în general este extrem de ridicată. De exemplu, macrofagul ingeră în 30 de minute echivalentul întregii plasmaleme, iar fibroblastele o treime din membrana lor plasmatică. Deoarece în acest interval volumul celular rămîne constant, înseamnă că simultan are loc o recirculare sau reciclare a membranei. Modul în care se produce reciclarea membranei nu este cunoscut prea bine, contribuind probabil la aceasta și o serie de vezicule a căror membrană nu a fost digerată de lizozomi. Majoritatea veziculelor sfîrșesc prin a fuziona cu lizozomii primari, formînd lizozomi secundari, locuri specializate ale digestiei intracelulare (1,4).

În unele celule, veziculele de endocitoză traversează citoplasma și eliberează conținutul lor prin exocitoză la nivelul unei alte suprafețe.

Endocitoza mediată de receptori a fost descrisă în primul rînd prin cercetările efectuate de J.L. Goldstein, M.S. Brown și R.G.W. Anderson (17) și constituie, în continuare, datorită importanței sale deosebite, obiectul unor investigații aprofundate (următoarele treceri în revistă conțin aplicații în medicină: 12, 13, 34, 47, 55). Endocitoza mediată de receptori, denumită uneori și *clatrinică* se produce prin intermediul receptorilor de la nivelul membranei plasmatice, care recunosc macromolecule din lichidul extracelular. După formarea complexelor ligand-receptor acestea difuzează în o serie de zone din plasmalemă, care apar la microscopul electronic ca niște depresiuni (*„coated pits"*) căptușite pe fața citoplasmatică de proteine particulare. Depresiunile, denumite și caveole, se accentuează pînă cînd devin vezicule de endocitoză (fig. 17). Veziculele rămîn și după internalizare o perioadă de timp cu „îmbrăcămintea" de proteine. Nu se cunoaște compoziția învelișului proteic în întregime, dar a fost izolată cea mai importantă dintre proteinele „tapetului" *clatrina*. Ea are greutatea moleculară de 180 000 daltoni și se asociază într-o structură caracteristică, denumită triskelion. Din această unitate de bază se formează, asemenea unei plase, rețeaua de clatrină care îmbracă inițial depresiunile și apoi veziculele. Uneori, clatrina căptușește

Scanned with OKEN Scanner

numai depresiunea, pentru ca în momentul cînd se formează vezicula aceasta să se strecoare printre ochiurile rețelei. Există deci și vezicule neîmbrăcate, care sînt denumite receptozomi, pentru a le deosebi de pinozomi, veziculele rezultate prin endocitoză independentă de receptori (1).

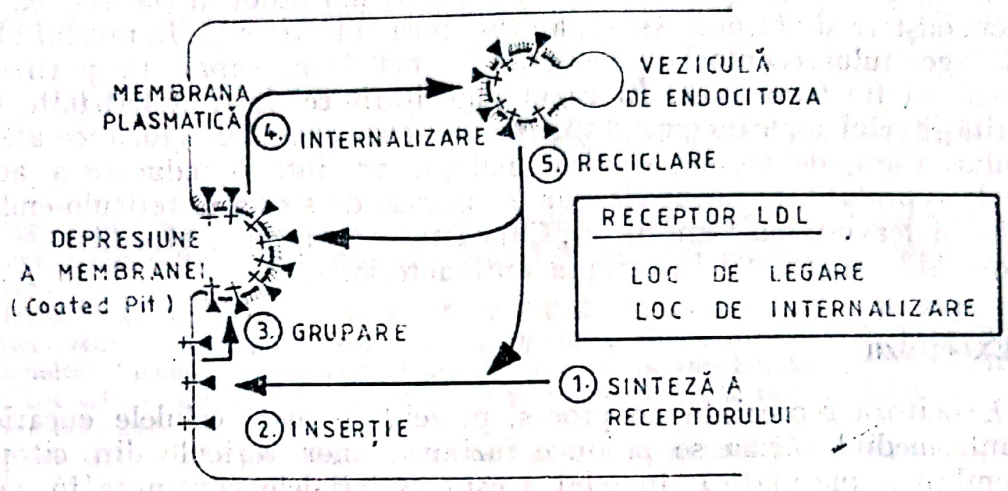


Fig. IV. 17 — Reprezentarea originală (J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, M. S. Brown, 1982) a endocitozei de tip clatrinic, mediată de receptori. Sistemul LDL—receptor este exemplul consacrat, demonstrat experimental, de endocitoză mediată prin receptori.

Importanța endocitozei prin intermediul receptorilor decurge din concentrarea selectivă, care permite celulelor să ingere o cantitate mare de liganzi specifici fără să fi încorporat un volum corespondent de lichid extracelular.

Unul dintre cele mai importante procese care se desfășoară prin intermediul endocitozei mediate de receptori este absorbția colesterolului de către celulele animale. Prelevarea colesterolului asigură furnizarea acestuia pentru sinteza membranelor. Se știe precis că dacă prelevarea este blocată, colesterolul se acumulează în sînge și poate contribui la formarea de plăci aterosclerotice în pereții vaselor sanguine. Întrucît acest proces, un model al eficacității cercetării fundamentale în relație cu clinica, a fost frecvent prezentat în diverse publicații, ne limităm a constata că în prezent se conturează și alte descoperiri asemănătoare.

5.1.2. *Fagocitoza*

Fagocitoza, modalitate de hrănire la protozoare, joacă la om și mamifere un rol important în procesele de apărare ale organismului. Vom menționa doar cîteva date mai noi. Astfel, deși tipurile celulare cu rol major în fagocitoză sînt macrofagele și neutrofilele, s-a constatat că majoritatea celulelor din organism pot prezenta, este drept de obicei foarte rar, proprietăți fagocitare. De asemenea, s-a demonstrat că funcția fagocitelor de îndepărtare a celulelor îmbătrînite este cantitativ mult mai amplă decît cea de distrugere a microbilor. De exemplu, macrofagele fagocitează 10^{11} globule roșii senescente în fiecare zi.

Rolul fagocitozei și al sistemului reticulo-endotelial în apărarea antimicrobiană a organismului este însă extrem de important, deoarece antibio-

ticele împiedică doar multiplicarea microbilor, pe cînd prin fagocitoză ei sînt distruși.

Fazele fagocitozei (chemotactismul, recunoașterea și atașarea fagocitelor de particule, înglobarea, omorîrea celulelor fagocitate și digerarea lor) au beneficiat de cunoașterea biomembranelor, îndeosebi în clarificarea etapei de recunoaștere și atașare. Astfel, au fost puși în evidență, la nivelul plasmalemei fagocitului receptori ce recunosc liganzi de pe suprafața particulei ce urmează să fie fagocitată. În cazul fagocitării celulelor îmbătrînite sau al majorității celulelor canceroase sînt recunoscute grupările glucidice ale glicocalixului. Cum, de regulă, celulele maligne prezintă o reducere a acidului sialic de suprafață, frecvent ele vor fi distruse de sistemul reticulo-endotelial înainte de dezvoltarea tumorii (4). Cunoașterea grupărilor glucidice de suprafață deschide și noi căi în terapia antibacteriană.

5.2. Exocitoza

Exocitoza reprezintă un proces, prezent în toate celulele eucariotelor, prin intermediul căruia se produce fuziunea unor vezicule din citoplasmă cu membrana plasmatică, în felul acesta materialele conținute în vezicule fiind vărsate în afara celulei. În afara transferului la exterior a produșilor secretați de celulă, fenomene de exocitoză se produc și la nivelul sinapselor (a se vedea cap. VIII).

5.3. Transcitoza

Transcitoza, formă particulară a transportului prin vezicule, realizează transportul macromoleculelor prin celulele endoteliului capilar. Contribuțiile românești în definirea transcitozei au fost decisive. G.E. Palade a observat primul, prin microscopie electronică, în citoplasma celulelor endoteliale vezicule ce traversează integral celulele, sugerînd rolul lor în transportul macromoleculelor din plasmă în afara patului vascular. Ulterior G.E. Palade și N. Simionescu au demonstrat că transportul prin transcitoză se produce în două moduri: a) prin vezicule independente ce se deplasează dinspre fața luminală a celulei endoteliale prin citoplasma acesteia, spre fața antiluminală sau interstițială; b) mai rar, veziculele pot forma un canal ce străbate integral celula (43).

G.E. Palade (citat de 4) sublinia că în transportul macromoleculelor pe lîngă dimensiunea acestora intervin sarcina electrică și proprietățile chimice ale moleculei. În acest sens, endoteliul capilar prezintă microdomenii încărcate negativ care, deoarece și proteinele sînt încărcate negativ, devin zone de transcitoză. Totodată, endoteliul vascular poate discrimina proteinele funcție de caracteristicile lor chimice. Nu este exclus ca în proces să intervină o serie de proteine adsorbite la nivelul suprafeței plasmalemei.

Contribuțiile cercetătorilor români în acest domeniu continuă, recent fiind demonstrată experimental transcitoza mediată de receptori (15).

Încheiem acest capitol cu repetarea mențiunii unei complementarități îndeosebi cu capitolul VII, ca și cu precizarea, din nou repetată, că au

Scanned with OKEN Scanner

fost prezentate doar tipurile fundamentale de transport prin membrane. În cazul sistemelor de microtransfer, identificarea și caracterizarea proteinelor de transport, ca și stabilirea exactă a compoziției (iar uneori a existenței canalelor ionice) reprezintă principalele direcții de cercetare. Ar putea rezulta de aici progrese decisive în înțelegerea mecanismelor moleculare ale transportului membranar dar și reconsiderări ale unor concepte acceptate în prezent.

Bibliografie selectivă

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. — Biologie moléculaire de la cellule, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986, pp. 286—315.
2. ALDRICH R. W., DIONNE V. E., HAWEOT E., STEVENS C. F. — în Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 491—516.
3. BENGA GH. — Biologia moleculară a membranelor, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979, pp. 195—217.
4. BENGA GH. — Biologie celulară și moleculară, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1985, pp. 99—113.
5. BEUTLER E., KUHL W., SACKS P. — N. Engl. J. Med., 1983, 309, 756.
6. BEZANILLA F., WHITE M. M. — în Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 437—448.
7. CARAFOLI E., PENNISTON J. — Pour la Science, 1986, 99, 78.
8. CHRISTENSEN H. N. — Biochim. Biophys. Acta, 1984, 779, 255.
9. CHRISTENSEN H. N., CURTHOYS N. P., MORTIMORE G. E., SMITH R. J. GOLDSTEIN L., HARPER A. E. — Federation Proc., 1986, 45, 2165.
10. CLAUSEN T. — Physiol. Rev., 1986, 66, 542.
11. DE ROBERTIS E. D. P., DE ROBERTIS Jr. E. M. F. — Biologie cellulaire et moléculaire, Les Presses de l'Université Laval, Quebec (Presses, Maloine S. A. Édit., Paris, 1983, pp. 191—235.
12. DICKSON R. B. — Trends Pharmac. Sci., 1985, 6, 164.
13. FALLON R. J., SCHWARTZ A. L. — Hepatology, 1985, 5, 899.
14. GECK P., HEINZ E. — J. Membrane Biol., 1986, 91, 97.
15. GHIȚESCU L., FIXMANN A., SIMIONESCU M., SIMOINESCU N. — J. Cell. Biol., 1986, 102, 1304.
16. GIORGI E. P. — Int. Rev. Cytol., 1980, 65, 49.
17. GOLDSTEIN J. L., ANDERSON R. G. W., BROWN M. S. — în Membrane Recycling, Pitman Books Ltd., London, 1982, pp. 77—95.
18. GUYTON A. C. — Neurophysiologie, Edit. Masson, Paris, 1984, pp. 5—15.
19. HARRISON R., LUNT G. — Biological Membranes, Second Edit., Blackie, London, 1980, pp. 166—237.
20. HOFFMAN T. F. — în Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 221—234.
21. JACKSON M. J. — în Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 235—247.
22. JODAL M., LUNDGREN O. — Acta Paediatr. Scand., 1983, Suppl. 305, 49.
23. JORGENSEN P. L. — Biochim. Biophys. Acta, 1982, 694, 27.
24. JORGENSEN P. L. — Kidney Internat., 1986, 29, 10.
25. KEPES A. — Aspects moléculaires des fonctions membranaires, Masson, Paris, 1978, pp. 45—104.
26. KNAUF P. A. — în Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 191—220.

Scanned with OKEN Scanner

27. KUNTZ I. D., ZIPP A., — N. Engl. J. Med., 1977, 297, 262.
28. LEVIN R. J. — The Living Barrier, Heinemann, London, 1969, pp. 65—156.
29. LEVITT D. G. — Biochim. Biophys. Acta, 1980, 604, 321.
30. MACKNIGHT A. D. C., LEAF A. — in Physiology of Membrane Disorders (sub red. J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 311—328.
31. MĂRGINEANU D. G., ISAC M. I., TARBA C. — Biofizica, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980, pp. 88—107.
32. OVCHINNIKOV Y. A. — Eur. J. Biochem., 1979, 94, 321.
33. PAPPONE P. A., CAHALAN M. D. — in Physiology of Membranes Disorders (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company New York and London, pp. 249—272.
34. PARSEGIAN V.A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, 264, 161.
35. RACKER E. — Acc. Chem. Res., 1979, 12, 338.
36. ROSENBERG H. C., CHIU T. H., PUTNEY Jr. J. W., ASKARI A. — in Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S.G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 369—383.
37. SCARBOROUGH G. A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1982, 37.
38. SCHAFER J. A., ANDREOLI R. E., — in Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 177—190.
39. SCHULTZ S. G. — in Physiology of Membrane Disorders, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 283—294.
40. SHA'AFI R. I. — in New Comprehensive Biochemistry, Vol. 2, (sub red. S. L. Bonting, J. J. H. H. M. de Pont), Elsevier, Amsterdam, 1981, pp. 29—60.
41. SHECHTER E. — Membranes biologiques, Masson, Paris, 1984, pp. 83—205.
42. SILK D. B. A. — Clin. Sci., 1981, 60, 607.
43. SIMIONESCU N. — in International Cell Biology 1980—1981, (sub red. H. G. Schweiger), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1981, pp. 657—672.
44. SKOU J. C. — Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 394.
45. SKOU J. C. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1986, 46, Suppl. 180, 11.
46 SONNENFELD R., HANSMA P. K. — Science, 1986, 232, 211.
47. STAHL P., SCHWARTZ A. L. — J. Clin. Invest., 1986, 77, 657.
48. STEIN W. D. — in Membrane Transport, (sub red. S. L. Bonting, J. J. H. H. M. De Pont), Elsevier, Amsterdam, 1981, pp. 1—28, 123—137.
49. STRYER L. — La Biochimie, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1985, pp. 912—935.
50. SWEADNER K. J., GOLDIN S. M. — N. Engl. J. Med., 1980, 302, 777.
51. TRACHTENBERG M. C., PACKEY D. J., SWEENEY T. — Curr. Top. Cell Regul., 1981, 19, 159.
52. VASILESCU V., MĂRGINEANU D. G., — Introducere in neurobiofizică, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1979, pp. 51—61.
53. WARDLE E. N. — Cell Surface Science in Medicine and Pathology, MTP Press Ltd., Lancaster, 1985, pp. 57—79.
54. WEINSTEIN A., STEPHENSON J. L., SPRING K. R. — in Membrane Transport, (sub red. S. L. Bonting, J. J. H. H. M. De Ponts), Elsevier, Amsterdam, 1981, pp. 311—351.
55. WILEMAN T., HARDING C., STAHL P. — Biochem. J., 1985, 232, 1.
56. WILLIS E. D. — Biochemical Basis of Medicine, Wright, Bristol, 1985, pp. 18—32.

Scanned with OKEN Scanner

V. Sistemele de comunicare intercelulară; receptorii membranari

„Sistemele de comunicare intercelulară reprezintă fundamentele integrării, adică ale coordonării activităților celulare necesare pentru asamblarea și funcționarea țesuturilor, organelor, iar în ultimă instanță a organismului întreg"

M. PAVANS DE CECCATTY (1983)

În prezent, linia directoare din cercetarea fundamentală constă în fragmentarea analitică, a oricărui sistem complex, pînă la moleculele componente. Ca urmare, sînt descoperite rînd pe rînd molecule noi, iar altele deja inventariate sînt investigate pînă la nivelurile structurii, organizării conformaționale și a interacțiunilor. În practica medicală, însă, prezintă interes în primul rînd acele date care prin intermediul cercetării clinice să ofere o imagine globală asupra structurii și funcțiilor țesuturilor, organelor și organismului întreg. Se confruntă, deci, într-o măsură, o tendință „reducționistă" în cercetare și una „organicistă" în clinică. Chiar cercetătorii au recunoscut impasul creat de avansul analitic impresionant care nu este în aceeași măsură acompaniat de concepte și explicații integrative. Astfel, G.E. Palade și M. G. Farquhar apreciau că: „Deficiențele cele mai importante în cunoașterea noastră privesc, deopotrivă, mecanismele care reglează funcția fiecărui organ celular și în particular activitățile specializate la multitudinea diverselor componente subcelulare" (64).

Totuși, în ultimii ani, acumularea progresivă a rezultatelor obținute în domeniul biomembranelor și a structurilor asociate acestora, a permis un contur suficient de clar al sistemelor de comunicare intracelulară. Acestea reprezintă cheia înțelegerii funcționării armonioase a celor aproximativ 1×10^{17} celule din organismul uman. Comunicarea între celule este necesară începînd cu dezvoltarea și organizarea acestora în țesuturi, continuînd cu controlul creșterii și diviziunii, ca și pentru coordonarea diverselor activități ale celulelor mature (66).

Cînd celulele organismului își coordonează activitățile lor astfel încît rezultă un ansamblu funcțional coerent, ele stabilesc *un sistem de comunicare* de care depind procesele fiziologice. Concomitent, în o serie de boli alterarea comunicării are un rol patogenetic particular (a se vedea cap. VIII, IX, XI).

Scanned with OKEN Scanner

1. MODALITĂȚI DE COMUNICARE INTERCELULARĂ

Cu toată diversitatea proceselor de la nivelul celulelor se pot distinge un număr limitat de căi prin intermediul cărora se realizează schimbul mesajelor (fig. 1).

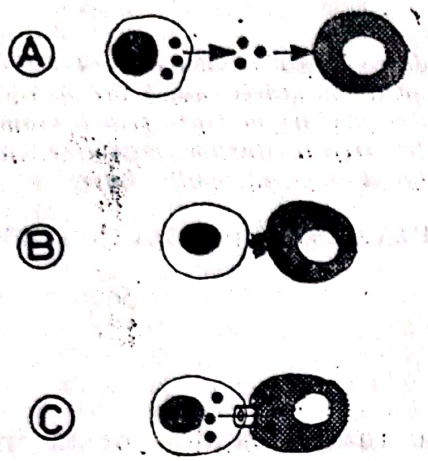


Fig. V. 1 — Reprezentarea schematică a căilor de comunicare intercelulară: A) transmitere indirectă, la distanță; B) și C) transmitere directă, între celule aflate în contact.

1.1. Celulele la distanță

În primul rînd, celulele pot schimba între ele, *la distanță* mare, mesaje care difuzează în mediul pericelular. Acesta este cazul a două mecanisme fundamentale de transmitere a informației: a) *transmiterea nervoasă*, adaptată comunicării rapide și selective a mesajelor; b) *transmiterea umorală*, care survine consecutiv eliberării unui mesager chimic în torentul circulator și este adecvată transmiterii de informații generale, de exemplu metabolice. În ambele cazuri, membranele celulare au un rol principal, îndeosebi prin existența la nivelul suprafeței celulelor țintă a unor receptori specifici.

1.2. Contactul celular direct

O a doua alternativă de comunicare rezultă din *contactul direct* al celulelor, care poate fi *permanent* sau *episodic*, cînd mesajele se transmit fără o difuziune prea importantă în spațiile extracelulare. Contactul direct permanent se realizează de obicei prin intermediul joncțiunilor permeabile, de tip *„gap"*, care leagă direct compartimente citoplasmatice ale celulelor ce acționează una asupra alteia.

Contactul intercelular direct poate fi și efemer, tranzitoriu, exemplul tipic fiind reprezentat de cooperarea celulelor sistemului imunitar, care transmit de regulă informația printr-un contact episodic (16).

1.3. Conjugarea celor două alternative

A treia posibilitate este derivată, constînd în *conjugarea celor două alternative* anterioare, celulele schimbînd în acest caz mesaje la distanță, servindu-se de o rețea și de contactele sale interpuse. Este cazul, de exemplu, al rețelei nervoase dintre celulele senzoriale și cele musculare.

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, în organism, moleculele semnal endogene pot fi distinse convenţional în trei categorii (fig. 2): a) cea mai mare parte a celulelor secretă unul sau mai multe semnale chimice denumite *mediatori chimici locali*, deoarece ei sînt atît de rapid captaţi şi distruşi, încît acţionează numai asupra celulelor strict învecinate celulei de origine; b) celulele glandelor endocrine secretă hormoni, care circulă în sînge pentru a acţiona asupra celulelor ţintă, de regulă dispersate în tot organismul şi dotate cu receptori specifici situaţi la nivelul plasmalemei, ori, mai rar intracelular; c) în fine, neuronii formează cu celulele ţintă joncţiuni specializate (sinapse chimice) secretînd cantităţi mici de *neurotransmiţători*, care acţionează exclusiv asupra celulelor ţintă adiacente (fig. 2).

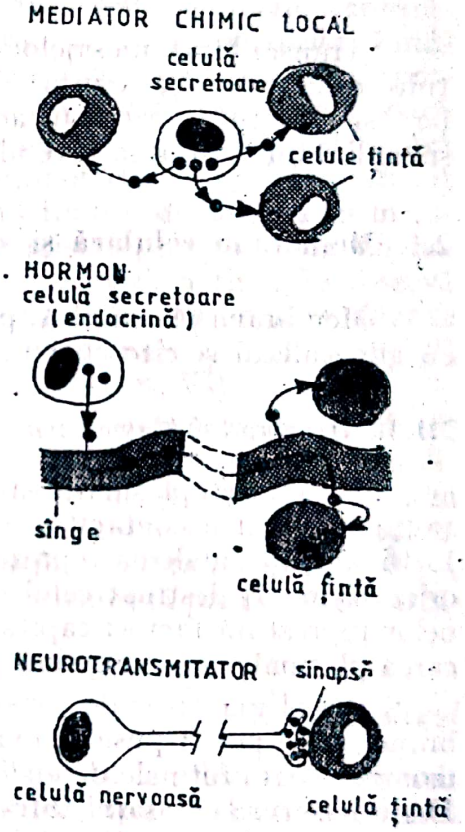


Fig. V. 2 — Trei categorii diferite de molecule extracelulare purtătoare de informaţie.

În realitate, împărţirea moleculelor în cele trei categorii se dovedeşte uneori convenţională (a se vedea subcap. 3), pe lîngă faptul că ea se referă doar la semnalele de origine endogenă.

Dintre toate celulele din organism, cele endocrine şi nervoase ocupă locul central în transmiterea semnalelor necesare coordonării activităţii miliardelor de celule din organism. Comparativ, celulele neuronale transmit mult mai rapid informaţia deoarece nu depind, asemenea celulelor endocrine, de difuziune sau de transportul pe cale circulatorie. După cum se ştie, în cazul neuronilor, impulsurile electrice transmit rapid semnalul de-a lungul fibrelor nervoase. Aceste impulsuri sînt convertite în semnale chimice doar la nivelul terminaţiilor nervoase, ceea ce înseamnă că neurotransmiţătorul trebuie să difuzeze, pînă la celula ţintă, pe o distanţă microscopică. De aceea, procesul durează mai puţin de o milisecundă. Condiţiile menţionate au consecinţe asu-

pra concentrației moleculelor purtătoare de informație: hormonii sînt puternic diluați și trebuie să acționeze la nivelul celulelor țintă la concentrații reduse (în general $<10^{-8}$M), în timp ce neurotransmițătorii sînt mult mai concentrați. Cu toate aceste deosebiri, mecanismele de transmitere a semnalelor sînt similare și, în plus, așa cum s-a demonstrat îndeosebi în ultimii ani, multe molecule informaționale endocrine sînt utilizate de către neuroni (1,66).

2. COMPONENTELE MOLECULARE ALE SISTEMELOR DE COMUNICARE INTERCELULARĂ

Transmiterea mesajelor celulare, la distanță sau consecutivă contactului direct angajează următoarele componente moleculare: membrana celulară și structurile asociate acesteia, semnalele biochimice și bioelectrice, ca și mediul interstițial la nivelul căruia circulă semnalele.

2.1. Membrana celulară și structurile asociate

Membrana plasmatică (plasmalema) este asociată structural și funcțional cu glicocalixul și citoscheletul.

2.1.1. *Membrana plasmatică*

Membrana plasmatică intervine atît în transmiterea informației la distanță cît și prin contact direct la emisia inițială a semnalelor și la recepția lor finală. Plasmalema reprezintă structura de control la intrarea și la ieșirea oricărui mesaj destinat celulei. Compoziția, structura și funcțiile biomembranelor reprezintă factori capitali în transmiterea informației. În esență, implicarea plasmalemei se exprimă prin intermediul a trei alternative globale.

a) Cel mai ușor de constatat sînt modificările morfologice ale biomembranei, care pot fi puse în evidență prin diferite tehnici de microscopie electronică. Toate formele de endocitoză, exocitoză și transcitoză (a se vedea cap. IV) pot servi la pasajul intra- sau extracelular al informației. Exemple clar demonstrate în acest sens sînt: endocitoza virusurilor consecutiv adsorbției lor la nivelul receptorilor membranari, proces ce conduce la transmiterea intracelulară a informației virale specifice; endocitoza complexelor LDL-receptori care a condus la cunoașterea perfectă a circuitului colesterolului; în fine, exocitoza secretorie a oricărui hormon polipeptidic (a se vedea cap. IV).

b) Altă categorie amplă constă în modificările moleculare ale membranei plasmatice neobservabile pe plan ultrastructural. Ele sînt detectabile doar uneori, cu ajutorul unor marcheri. Este cazul în primul rînd a unor variații de permeabilitate, care pun în relație mediul extracelular cu citoplasma pentru transferul unor mesageri: ioni, acizi aminați, hormoni etc. De asemenea, la celulele în contact prin intermediul joncțiunilor permeabile de la nivelul membranei, transmiterea mesajelor se produce prin procese de permeabilitate.

Scanned with OKEN Scanner

c) Cea mai subtilă și cea mai importantă alternativă constă în transducția mesajelor, care nu antrenează nici o penetrare de mesager, ci doar legarea acestui mesager la nivelul unui receptor specific, cu transmiterea consecutivă a informației specifice intracelular. Este de mare interes observația că în ciuda diversității enorme a moleculelor informaționale structura proteinelor receptoare de la nivelul plasmalemei este, în general, „monotonă", iar numărul sistemelor de transducție este foarte limitat. Vom dezvolta acest aspect în ultima secțiune, subcapitolul 3.

2.1.2. *Citoscheletul*

Citoscheletul (a se vedea cap. VI) intervine în interacțiunile celulare prin intermediul tuturor componentelor sale. Multiplele fațete ale activităților citoscheletului nu permit totdeauna o viziune clară a fenomenelor. Limitîndu-ne de exemplu la limfocitele *in vitro*, tratarea cu concanavalină A provoacă o fixare generalizată a receptorilor din membrană, indiferent dacă celulele recunosc sau nu lectina. Microtubulii vor servi în acest caz ca structură de ancorare, imobilizînd proteinele receptoare. Dimpotrivă, semnalul constituit de un anticorp anti-imunoglobuline de suprafață induce deplasarea în membrană și dispunerea proteinelor receptoare în capișon *(capping)* la un pol al celulei (57, 66). De astă dată intervin microfilamente de actină. Se observă că natura semnalului și a receptorului conduce la intervenții foarte diferite ale citoscheletului. Mai greu de explicat sînt fenomenele de *„co-capping"* al mai multor proteine receptoare (16, 66) (a se vedea cap. VI).

Nu este posibil, deci, să se atribuie o funcție univocă fiecăruia dintre elementele citoscheletului. Totul depinde de tipurile celulare, semnalele utilizate, categoriile de elemente membranare implicate, ca și de etapa ciclului celular. Se conturează totuși conceperea citoscheletului ca un „complex-modulator al suprafeței celulare" sau SMA *(surface modulating assembly)*, în cadrul căruia microtubulii și microfilamentele orientează prin asociere arhitectura funcțională a plasmalemei (61).

2.1.3. *Glicocalixul*

Întrucît nu ne-am referit într-o secțiune distinctă la glicocalix, denumit și glicolemă, sau *cell-coat* („îmbrăcămintea" celulei), vom preciza că această entitate structurală este alcătuită din grupările glucidice ale glicoproteinelor și glicolipidelor intrinseci ale plasmalemei, dar și din glicoproteine extrinseci și proteoglicani secretați de celule și adsorbiți apoi la suprafața celulei (fig. 3). Amploarea glicolemei este variabilă: a) la celulele în cultură se simplifică; b) membranele celulelor în contact sînt separate de un spațiu de 20—30 nm, în care se află glicolema celulelor vecine; c) la celulele neangajate în interacțiune, cu celulele vecine, libere (celulele sanguine) sau de suprafață (de pildă, polul apical al celulelor mucoasei intestinale) grosimea glicocalixului poate atinge 50 nm.

Delimitarea reală a glicolemei în raport cu matricea extracelulară este destul de convențională.

Din cele circa 100 monozaharide naturale, în glicoproteinele și glicolipidele de la nivelul membranelor și glicocalixului se găsesc numai 9, cele mai

Scanned with OKEN Scanner

importante fiind: galactoza, manoza, fucoza, galactozamina, glucozamina, glucoza și acidul sialic. Resturile de acid sialic se află la capătul lanțurilor oligozaharidice și determină sarcina negativă a suprafeței celulelor eucariote (10).

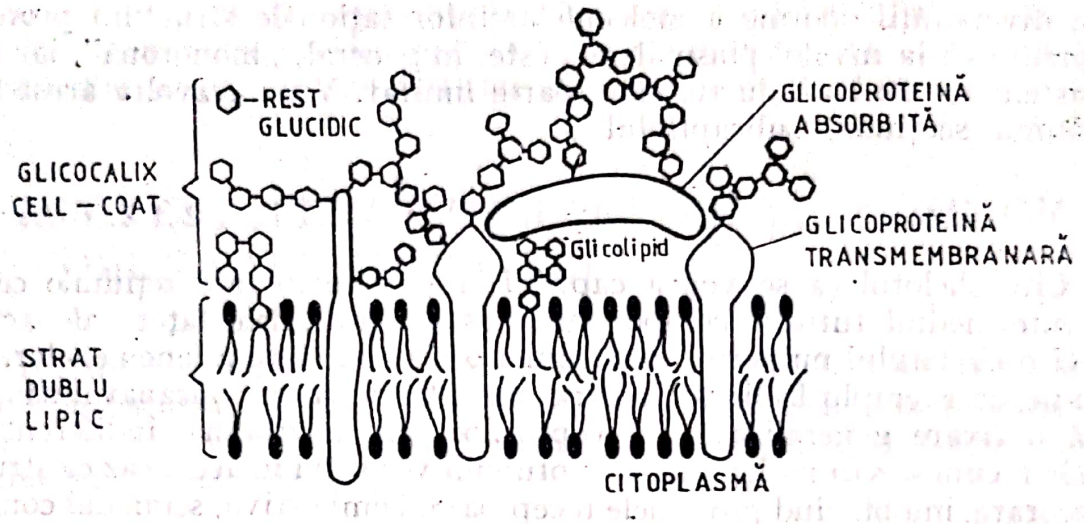


Fig. V. 3 — Structura glicocalixului și dispunerea sa în raport cu plasmalema (După B. Alberts și colab., 1986) (5).

Cu toate că interfața glucidică dintre celulă și mediul său prezintă o structură și o independență variabile, o proprietate a sa rămîne esențială: glicocalixul exprimă individualitatea celulară („cartea de identitate a celulei") prin intermediul numeroaselor variante moleculare determinate de monozaharidele componente. În moleculele membranare, partea oligozaharidică introduce o heterogeneitate periferică, în contrast cu constanța lanțului polipeptidic. Dacă, de exemplu, 3 aminoacizi distincți pot da naștere la 6 tripeptide diferite, 3 monozaharide pot produce 1056 trizaharide diferite. În acest mod, informația strict genetică înscrisă în proteine este considerabil îmbogățită (66). Identitatea celulară este exprimată nu numai funcție de specie, dar și de tipul celular. Printre alte funcții ale glicocalixului menționăm: a) participarea cu matricea extracelulară, la determinarea adeziunii intercelulare; b) conține grupările glucidice ale proteinelor-receptori de la nivelul membranei, ca și ale unor proteine implicate în fenomenele de transport; c) are probabil și rolul de depozit pentru cationi (de exemplu Ca^{2+}), datorită sarcinilor electrice negative ale glicolemei; la nevoie, cationii aflați în rezervă la acest nivel, ar putea fi mobilizați în celulă (1, 10, 27).

Un exemplu de rol al acestei structuri în transmiterea informației îl constituie explicarea modului în care hematiile sînt blocate și eliminate, după circa 120 zile de viață, în ficat și splină. Eliminarea este efectuată de receptori ai celulelor hepatice și splenice, care recunosc glicoproteinele și glicolipidele „uzate" ale suprafeței globulului roșu. Lanțurile oligozaharidice ale acestora din urmă au pierdut acidul sialic și, deci, „uzura" înseamnă desializare. Prin pierderea acidului sialic rămîne descoperită la capătul lanțului oligozaharidic galactoza, care în mod normal ocupă locul penultim în lanț. Galactoza este recunoscută de receptori, se produce astfel o imobilizare a hematiei, cu fagocitarea și distrugerea consecutive la nivelul lizozomilor secundari, îndeosebi în macrofagele specializate ale ficatului, celulele Kupffer.

Scanned with OKEN Scanner

Reflectînd „personalitatea" celulei nu numai din punct de vedere genetic, dar și funcție de mediu și interrelațiile celulare, „îmbrăcămintea" celulei este prin excelență un modulator al comunicării intercelulare și al relațiilor celule-mediu. Delimitarea sa, cu frontiere imprecise, are mai mult o valoare operatorie și nu este exclus ca în perspectivă, ținînd seama de faptul că și citoscheletul prezintă o situație similară, aceste două formațiuni moleculare să fie reunite împreună cu membrana plasmatică într-un concept comun. Deocamdată, supoziția este susținută cel puțin din punct de vedere funcțional.

2.2. Mesageri, mesaje și semnale

Cea de a doua componentă a sistemelor de comunicare intercelulară este de o diversitate al cărei inventar complet este încă departe de finalizare. Pe de altă parte, aceeași diversitate se exprimă în ceea ce privește natura și semnificația mesagerilor intercelulari. Mecanismele fundamentale de comunicare rămîn însă foarte limitate ca tipuri, ceea ce facilitează integrarea tipurilor variate de mesaje în cadrul unor căi comune.

În noua perspectivă a comunicării intercelulare, chiar interpretarea rolului unei molecule clasice, asemenea glucozei, se amplifică. Glucoza este un veritabil semnal chimic, o substanță „semantoforă", deoarece glicemia reprezintă o informație percepută de celulele endocrine pancreatice α și β, care ca răspuns secretă fie glucagon (α) pentru creșterea glicemiei, fie insulină (β) pentru diminuarea acesteia. Prin transferurile de glucoză din organism se analizează în mod tradițional sisteme în care glucoza are un rol trofic, structural sau energetic. Încă și mai complexe sînt mecanismele de transport și schimb, precum și secvențele metabolice în care este implicată glucoza. Concomitent există fenomene membranare de eliberare și captare a glucozei, procese intercelulare de circulație și retenție, ca și o reținere a moleculelor în spațiile conjunctive. Aceste diferențe extrem de complexe se atenuează însă dacă se analizează fenomenele în termenii comunicării intercelulare. În mod surprinzător, întreaga diversitate de procese la care participă glucoza se reduce, din punct de vedere al comunicării intercelulare la cele două modalități: interacțiuni la distanță și prin contact între celule. Utilitatea unei astfel de abordări se exprimă atît în fiziologie cît și în fiziopatologie (66).

Enumerăm în continuare, principalele sisteme de semnale. Uneori moleculele mesager asociază mai multe semnale.

2.2.1. *Hormonii*

Hormonii nu mai pot fi considerați produși exclusiv al glandelor endocrine. Mai mult decît în cazul altor substanțe, acțiunea hormonilor depinde de fenomene de recunoaștere, fixare și „lectură" a mesajelor caracteristice de către receptori specifici (a se vedea subcap. 3).

În cadrul unui studiu general al comunicării intercelulare, datele furnizate de către hormoni sînt de un alt ordin decît acelea aduse de o clasificare structurală sau fiziologică. Astfel, din această perspectivă se relevă, mai întîi, geneza mesagerilor chimici conform unor procese secvențiale care, dincolo de căile biosintezei intracelulare (abordate în descrierile fiziologice),

Scanned with OKEN Scanner

modelează progresiv molecule „mute" pînă la obținerea finală a unei substanțe cu valoare de semnal. Un exemplu edificator, este cazul testosteronului, care, elaborat de celulele endocrine din testicul, constituie un semnal direct imediat pentru mușchi, rinichi și alte structuri celulare, provocînd efecte metabolice și de diferențiere. Pentru alte teritorii țintă care captează hormonul, ca prostata și pielea, testosteronul este însă o moleculă silențioasă. Numai după modificarea sa enzimatică, prin reducere, se va transforma în androstan, activ la aceste niveluri. Se degajă de aici, și din alte fenomene comparabile, noțiunea de prehormon, sau mai general, presemnal.

Noțiunea de presemnal reapare în cazul hormonilor tiroidieni T_3 și T_4. Ambii sînt polivalenți ca acțiuni și direct activi asupra aproape a tuturor țesuturilor. Totodată, T_4 suferă în diverse organe o deiodare care dă naștere la T_3, mult mai activ decît T_4. Această conversie de T_4 în T_3 în teritorii extratiroidiene induce supoziția că T_3 ar putea fi principalul hormon tiroidian, iar T_4 un precursor al său, un prohormon. Distincția dintre pre- și prohormoni nu este clară, unii autori utilizînd chiar termenul de preprohormon.

2.2.2. *Neurohormonii și neuromediatorii*

Studiul numeroșilor mesageri din sistemul nervos scapă tuturor clasificărilor tranșante. Din punct de vedere al comunicării intracelulare însă se constată și în această diversitate de mesageri purtători de informații multiple, același număr redus de modalități.

Neuropeptidele ilustrează cel mai bine „economia biochimică" a semnalelor pe baza a două procese: 1) existența unui precursor unic și silențios, din care se pot detașa fragmente purtătoare de informație, acționînd fiecare într-un domeniu diferit, pe celule țintă distincte; 2) înlocuirea anumitor reziduuri prin altele poate modifica total sensul mesajului.

2.2.3. *Semnalele bioelectrice*

Semnalele bioelectrice reprezintă combinații variabile de potențiale de acțiune cuasiidentice conținînd mesaje pentru care, de altfel, modalitățile de recepție, descifrare și transducție sînt finalmente chimice. Totuși, comunicările intercelulare electrice sînt de o polivalență funcțională aparent infinită, prin modularea cîtorva mecanisme ionice de bază, care permit controlul unei multitudini de activități. Semnalele și mesajele bioelectrice exprimă fie un răspuns la alte semnale și mesaje de stimulare (biochimice sau biofizice), fie activitatea spontană a unui program celular endogen.

2.2.4. *Ionii și nucleotidele*

Ionii și nucleotidele se situează printre semnalele cele mai simple. Ionii anorganici mono- și divalenți sînt cei mai răspîndiți, acționînd la trei niveluri: a) *intracelular*, unde determină, direct sau indirect un mare număr de procese; un rol major îl are Ca^{2+}, îndeosebi prin asocierea sa cu calmodulina; b) la nivel *transmembranar*, unde fluxurile intra- sau extracelulare de Na^+, K^+, Ca^{2+} antrenează modificări semnificative ale biopotențialelor; c) *intercelular*, prin stabilirea unor gradiente extracelulare de concentrație, la care celulele sînt sensibile.

Scanned with OKEN Scanner

În același repertoriu cu al ionilor pare să se înscrie *AMP-ciclic* (a se vedea sub cap. 3). Pornind de la similitudinile constatate, unii autori regrupează ionii și nucleotidele într-un ansamblu de mesageri chimici sinonimi sau complementari. Sinonimia implică aceeași semnificație metabolică : concentrațiile lor variază în același sens, iar efectele sînt similare. Complementaritatea se justifică, la rîndul său, pe acțiuni și concentrații opuse celor precedente. S-a propus astfel, în ceea ce privește acțiunile sinonime pentru anabolismul activităților de sinteză asocierea GMP, GDP, ATP, K^+ și Mg^{2+}, iar pentru catabolism și activități de degradare sincronismul AMP, GTP, ADP, Na^+, și Ca^{2+}. Complementaritatea apare din asocierea perechilor GMP-GTP, GDP-GTP, ATP-ADP, K^+-Na^+, Mg^{2+}-Ca^{2+}. În realitate, există suficiente excepții de la aceste delimitări (66).

2.2.5. *Polinucleotidele și ARN*

Două argumente au incitat investigarea rolului de mesager intercelular în acest caz: ARN este un constituent normal la nivelul multor suprafețe celulare, iar polinucleotidele exogene interacționează cu aceste suprafețe. ARN monocatenar ar conferi o specificitate particulară adeziunii celulelor în contact, dar a fost evocat și ca semnal liber circulant între celule și acționînd ca inductor.

2.2.6. *Virusurile și interferonii*

Prin transmiterea de la o celulă la alta, virusul poate fi considerat ca un mesager intercelular complex, iar interferonul drept expresia deturnării mesajului viral.

2.2.7. *Factorii de diferențiere și de creștere*

Ne vom referi pe scurt la șalone, eritropoietină și factorul de creștere nervoasă.

Șalonele, mesageri modulatori ai creșterii celulare, reprezintă o grupă de proteine sau de glicoproteine foarte eterogene ca masă: sub 4000 d șalonele eritrocitelor și granulocitelor, dar pînă la 50 000 șalonele limfocitare, 30 000 șalonele celulelor epidermice (18). Deși încă insuficient cunoscute, șalonele sînt definite ca substanțe produse de celulele diferențiate, care inhibă selectiv proliferarea celulelor germinative din aceeași linie. Mai multe experimente demonstrează că ele pot difuza la distanță, iar datorită faptului că mitozele sînt, în esență, procese identice la toate tipurile celulare, modul de acțiune al șalonelor, „specific" pentru un anumit țesut, nu poate fi explicat decît prin ipoteza existenței unor receptori membranari specifici pentru fiecare tip de celulă și șalonă (66).

Eritropoietina este un mesager glicoproteic purtător la distanță a unui semnal de stimulare a producerii de globule roșii, la mamifere. Deși considerată uneori „hormon hematopoetic" elementul inițial al stimulării sale este furnizat de un alt semnal: nivelul sanguin al oxigenului (22).

Factorul de creștere nervoasă (NGF) este un mesager polipeptidic, cunoscut ca un protagonist esențial al fenomenelor de creștere și de dezvoltare a sistemului nervos simpatic. El pare indispensabil la mamifere pentru creșterea normală, a lanțurilor simpatice și a rădăcinilor dorsale ganglionare. În materie de compoziție biochimică, structura sa covalentă (118 aminoacizi, 13259 d) evocă structura primară și secundară a insulinei. Ca acțiune se pare

Scanned with OKEN Scanner

că este singular, deoarece toți ceilalți „factori de creștere", de ordinul zecilor, izolați în ultimii ani, spre deosebire de NGF, sînt mitogeni *in vitro* (18).

2.2.8. *Anticorpii*

Anticorpii posedă o bogăție semantică depășind cu mult cea vizînd antigenele corespunzătoare. Astfel, ei acționează enzimele plasmatice din seria complementului, atrag prin chimiotactism celule ca monocitele și macrofagele, stimulează celulele responsabile de reacțiile alergice ș.a. În opoziție cu aceste efecte, pot deveni ei înșiși antigene, injectați la specii diferite, dar și în organismul care i-a produs. Această ultimă situație corespunde bolilor denumite autoimune (66). Faptul că numeroasele semnale purtate de un anticorp nu sînt rezervate exclusiv unei singure ținte permite imunoglobulinelor să realizeze o integrare între antigene, componentele plasmatice și celule. Sub acest aspect, imunoglobulinele reprezintă probabil moleculele integratoare cele mai complete din cadrul sistemelor de comunicare. După cum se știe, în ultimii ani se compară tot mai frecvent organizarea sistemului imunitar cu cea a sistemului nervos. Conceptul de „rețea imunitară" elaborat de K. Jerne incită și mai mult la această analogie, în care transmiterea mesajelor intercelulare poate deveni un criteriu de prim ordin.

2.2.9. *Antigenele*

Antigenele prezintă un mesaj complex, constînd în stimularea producerii de anticorpi, dar și în implicarea tuturor celulelor cu rol în răspunsul imunitar. Structural ei conțin situsuri specifice, variabile ca număr și cu semnificații diferite. Antigenele posedă, mai întîi, teritorii moleculare bine definite —haptenele—, care le determină antigenicitatea specifică. Acestea sînt structuri de recunoaștere pentru anticorpi, incapabile însă să provoace, prin ele însele, declanșarea sintezei de noi anticorpi. De aceea, structurile antigenice posedă unul sau mai multe situsuri de imunogenicitate, legate pe același suport molecular cu haptenele, dar „citite" independent. Interacțiunea locurilor de imunogenicitate cu țintele celulare este fiziologică și se traduce printr-o activare particulară a anumitor celule. Deci, dacă specificitatea strînsă a mesajului antigenic este fondată pe locurile haptenelor, a căror lectură selectivă este operată de anticorpi adecvați, dimpotrivă, conținutul fiziologic al mesajului, adică declanșarea unui răspuns imunitar, rezidă în restul moleculei, considerată ca un suport, sau transportor.

Antigenele de *histocompatibilitate* exprimă individul și specia, fiind mesageri purtători de semnale multiple distincte, cu rol foarte important în organizarea socială a organismului. O informație încă și mai precisă, poate fi furnizată de *antigenele de diferențiere*, care exprimă o stare celulară dată, normală sau patologică. De exemplu, prezența unor anumite antigene la nivelul membranei poate semnifica o stare tumorală. De exemplu, membrana plasmatică conține, în transformarea indusă de virusuri, antigene ale căror molecule sînt identice cu moleculele virusului. Celula tumorală exprimă uneori, de asemenea, antigene embrionare, denumite astfel deoarece în mod normal există la suprafața celulei numai în ontogeneză. Este cazul α-fetoproteinelor din tumorile hepatice, sau al antigenelor carcinoembrionare din tumorile intestinale. În fine, membrana celulei tumorale expune antigene de diviziune, a căror prezență este legată de activitatea mitotică. Nici unul dintre antigenele menționate nu poate fi considerat responsabil de perturbările

Scanned with OKEN Scanner

care survin în interacţiunile tumorii cu celulele netumorale (61). Antigenele de suprafaţă demonstrează că mesajul celulelor tumorale nu depinde de un anumit semnal.

Din această enumerare incompletă rezultă marea diversitate a generatorilor de semnale în procesele de transmitere a informaţiei la nivel celular.

2.3. Mediile şi compartimentele de transfer ale semnalelor

Transmiterea semnalelor diferă în funcţie de cele două alternative: la celulele în contact sau la distanţă.

2.3.1. *Transmiterea semnalelor la celulele în contact*

Transmiterea semnalelor *la celulele în contact* se efectuează prin intermediul joncţiunilor comunicante, care se pot stabili între celulele de numeroase categorii, atît *in vivo*, cît şi *in vitro*.

Deoarece la joncţiunile intercelulare ne referim şi în alte capitole, vom menţiona că acestea reprezintă structuri stabile diferenţiate între celulele învecinate, în cadrul cărora membranele plasmatice interacţionează foarte specific. Deşi considerate diferenţieri ale membranei, uneori la delimitarea lor structurală participă atît citoplasma cît şi spaţiul extracelular intermediar. Din punct de vedere funcţional, tradiţional ele sînt grupate în 3 categorii: 1) joncţiuni aderente sau de adezivitate, care asigură coeziunea între celule; 2) joncţiuni impermeabile (*occludens*), care pe lîngă funcţia de coeziune a celulelor în ţesuturi, obstrucţionează trecerea intercelulară a substanţelor; 3) joncţiuni de comunicare (*comunicans*), cu rol funcţional foarte important, permiţînd pasajul moleculelor mici de la o celulă la alta.

TABLL I

Tipuri de joncţiuni intercelulare

I — *Joncţiuni de adezivitate (desmozomi)*:
- 1 — desmozomi în centură (sau în bandă);
- 2 — desmozomi în „pată" (punctiformi);
- 3 — hemidesmozomi.

II — *Joncţiuni impermeabile (sau strînse)*
- 1 — joncţiuni strînse (*"tight junctions"*);
- 2 — joncţiuni cloazonate (numai la nevertebrate).

III — *Joncţiuni comunicante*
- 1 — joncţiuni permeabile (de tip *"gap"*);
- 2 — sinapse chimice.

Referindu-ne pe scurt la fiecare din categoriile de joncţiuni (fig. 4) vom menţiona că *desmozomii* sînt prezenţi îndeosebi la nivelul unor ţesuturi ce suportă forţe mecanice mari, conferindu-le acestora o rezistenţă. Este cazul în particular al epiteliilor, miocardului şi colului uterin. Desmozomii în centură sînt alcătuiţi din mănunchiuri de filamente de actină, formînd o bandă continuă în jurul celulelor epiteliale vecine, la capătul apical al acestora. Benzile sînt juxtapuse şi separate, în spaţiul intercelular, printr-un material filamentos puţin diferenţiat, cu rol de coeziune. *Desmozomii în „pată"* acţi-

Scanned with OKEN Scanner

onează ca niște nituri pentru menținerea celulelor în puncte de contact. Structural, un desmozom în „pată" este format din două discuri dense, denumite plăci citoplasmatice, deoarece sînt situate sub plasmalema celulelor vecine și din filamente subțiri ce unesc cele două plăci, străbătînd membrana plasmatică și spațiul intercelular (10). Ei servesc, de asemenea, la ancorarea filamentelor de cheratină (tonofilamente) care se întind în toată citoplasma. În fine, *hemidesmozomii*, prezintă numai o jumătate din structura desmozomilor în pată, deoarece unesc suprafața bazală a celulei epiteliale cu lama (lamina) bazală.

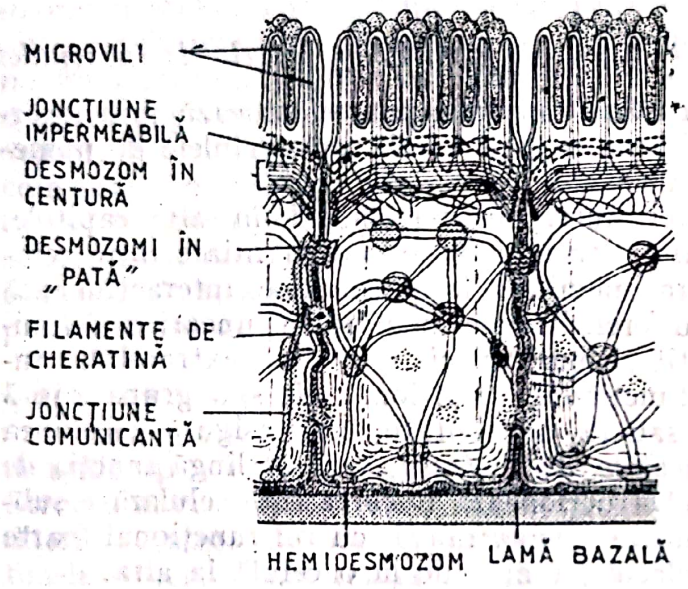


Fig. V. 4 — Reprezentare schematică a unei celule epiteliale intestinale cu zonele adiacente celulelor învecinate (explicații în text).

Joncțiunile impermeabile sau strînse rezultă din „sudarea" membranelor plasmatice de la nivelul celulelor vecine, încît spațiul intercelular lipsește cu desăvîrșire. La microscopul electronic aceste joncțiuni par formate prin intermediul unor perechi de proteine, care apar sub forma unor lanțuri liniare intramembranare. Proteinele realizează o centură alcătuită din numeroase lanțuri proteice ramificate și anastomozate.

Prin intermediul joncțiunilor strînse se împiedică scurgerea fluidelor printre celule, toate substanțele trecînd obligatoriu prin membrana plasmatică. Fenomenul este de o importanță particulară în cazul barierei hematoencefalice și la nivelul porțiunilor apicale ale tuturor celulelor ce delimitează lumenul unor cavități.

Joncțiunile de comunicare sînt de două tipuri, joncțiuni permeabile și sinapse (pentru acestea din urmă a se vedea cap. VIII).

Joncțiunile permeabile *(Gap jonctions)* sînt larg răspîndite în țesuturile tuturor animalelor. Ele se numesc comunicante, deoarece permit trecerea directă a moleculelor mici hidrofile din citoplasma unei celule în citoplasma altei celule. Se realizează astfel un cuplaj electric și metabolic al celulelor, fenomene ce permit comunicarea intercelulară la celulele alăturate (fig. 5).

Structurile care realizează aceste joncțiuni denumite *conexoni* sînt alcătuite din șase subunități proteice, fiecare cu greutatea moleculară de 27 000 daltoni. Conexonii din cele două celule care realizează joncțiunea se așează cap la cap, delimitînd canale sau pori de legătură cu diametrul de circa

Scanned with OKEN Scanner

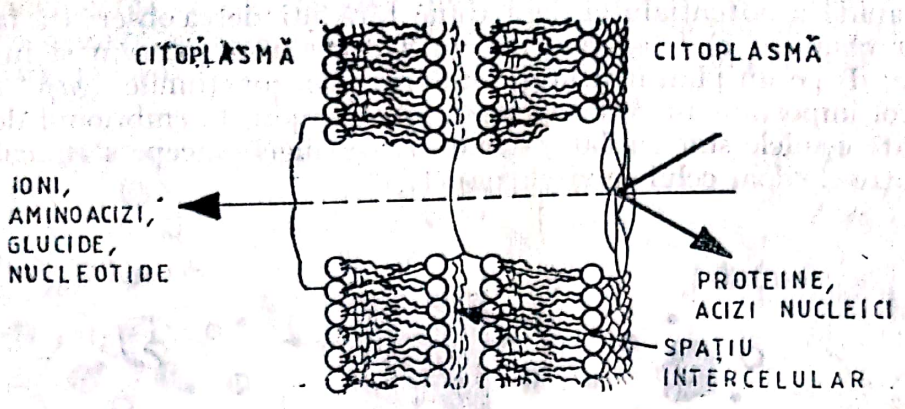


Fig. V. 5 — Joncțiunile comunicante dintre două celule epiteliale opuse sînt alcătuite din structuri hexagonale, inserate în stratul bilipidic al membranei. Cele două structuri hexagonale sînt în contact și reunesc cele două celule. Ionii, aminoacizii, glucidele, nucleotidele și alte molecule mici pot traversa joncțiunea. Dimpotrivă, joncțiunea este impermeabilă pentru proteine, acizii nucleici și alte molecule cu masă mare.

1,5—2 nm (fig. 6). Deși limitat, calibrul porilor permite celulelor cuplate să schimbe molecule sub 100—1 500 daltoni: ioni anorganici, oze, aminoacizi, nucleotide și vitamine. Nu pot trece acizii nucleici și proteinele. Fiecare joncțiune constă din sute de conexoni dispuși într-o rețea hexagonală, în planul membranei plasmatice (53).

În principiu, un asemenea tip de cuplare ar trebui să permită o cooperare metabolică între celulă, deoarece moleculele mici sintetizate de o subpopulație celulară din cadrul unui țesut ar putea fi partajate cu celelalte celule ale țesu-

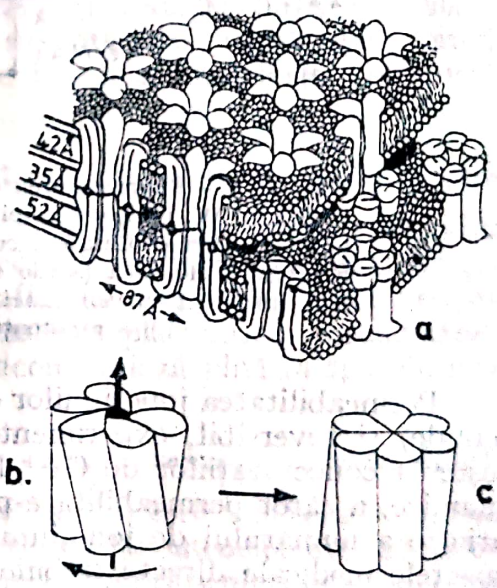


Fig. V. 6 — a) Reprezentarea schematică a unei joncțiuni de tip „*gap*" între două celule. b,c) Structura deschisă și închisă a conexonului, alcătuit din 6 subunități.

tului. Pentru moment, cooperarea metabolică a fost demonstrată doar în culturile de țesuturi. Dimpotrivă, cuplarea electrică prezintă o importanță deosebită în comunicarea intercelulară (fig. 7).

Cele mai relevante exemple de comunicare intercelulară directă, pe calea joncțiunilor permeabile sînt următoarele: a) cuplarea electrică permite sincronizarea contracțiilor celulelor miocardice și ale celulelor mușchilor netezi responsabili de peristaltismul intestinal; b) sinapsele electrice permit pro-

Scanned with OKEN Scanner

ır ea rapidă a potențialului de acțiune, fără întîrzierea observată la nivelul sinapselor chimice; c) fenomene de cuplare electrică intervin și în celulele senzoriale; d) pe un plan mai larg, cuplarea prin joncțiunile *„gap"* ar putea juca un rol important în embriogeneză (de exemplu, la embrionul de calmar inițial toate celulele sînt cuplate, dar după ce sîngele începe să circule rămîn cuplate între ele doar celulele viteliene) (1).

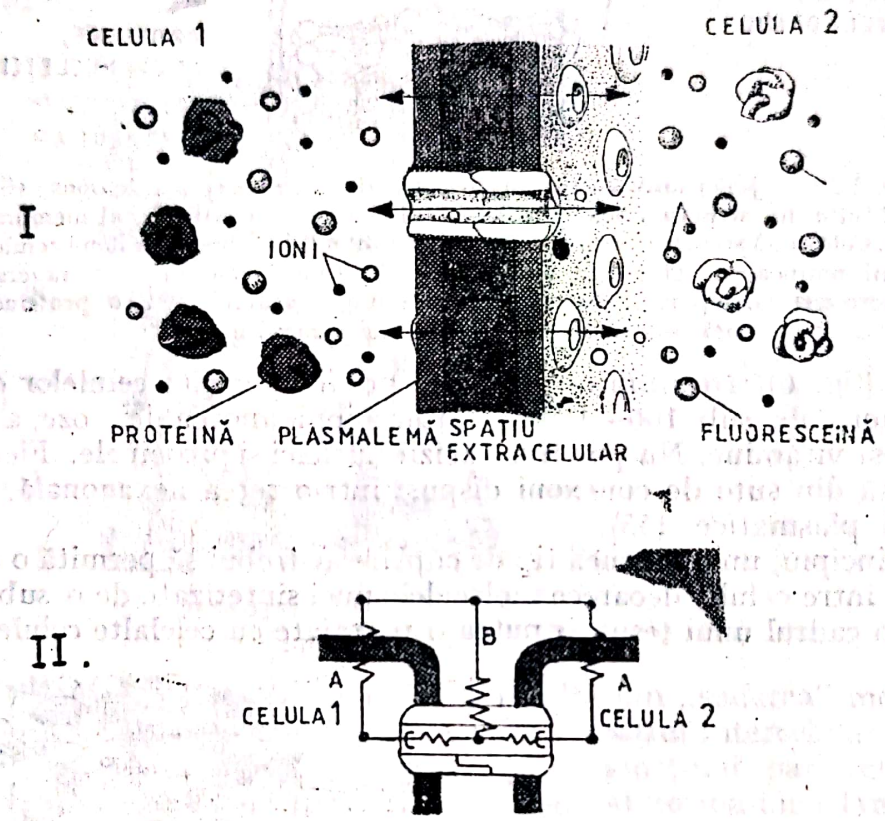


Fig. V. 7 — Reprezentarea clasică a joncțiunilor permeabile, aparținînd lui W. R. Loewenstein. Măsurarea a două caracteristici esențiale: I) Permeabilitatea, cu ajutorul marcherilor fluorescenți. II) Rezistența electrică (scade cu creșterea permeabilității joncțiunii): A) — rezistența plasmalemei; B) — rezistența „insulei" de joncțiune; C) — rezistența canalului de joncțiune.

Permeabilitatea joncțiunilor deschise poate fi diminuată rapid (în cîteva secunde) și reversibil, experimental prin scăderea pH-ului intracelular sau creșterea concentrațiilor de Ca^{2+} liber. De aici considerarea lor ca structuri dinamice, a căror permeabilitate poate fi controlată. Mai mult se constată o variație a numărului de joncțiuni în cadrul unor procese fiziologice. Dintre aspectele medicale directe trebuie observat că și în acest caz Ca^{2+} exprimă rolul său de semnal major; astfel în cazul unor traumatisme tisulare, în celulele lezate va pătrunde Ca^{2+}; abundent extracelular, cationul va suprima rapid comunicarea prin joncțiuni dintre celulele lezate și cele normale, prevenindu-se în acest mod extinderea leziunilor. După vindecare joncțiunile se restabilesc (fig. 8). În patologia generală, existența comunicării prin joncțiunile deschise explică de ce, de regulă, o boală nu se limitează la afectarea unor celule individuale, ci la o parte sau chiar la un organ întreg (53).

Scanned with OKEN Scanner

Comunicarea la celulele în contact, deşi mai redusă ca anvergură în raport cu comunicarea la distanţă (şi considerată ca un sistem primitiv de comunicare, prezent şi la animalele inferioare) deţine o importanţă certă.

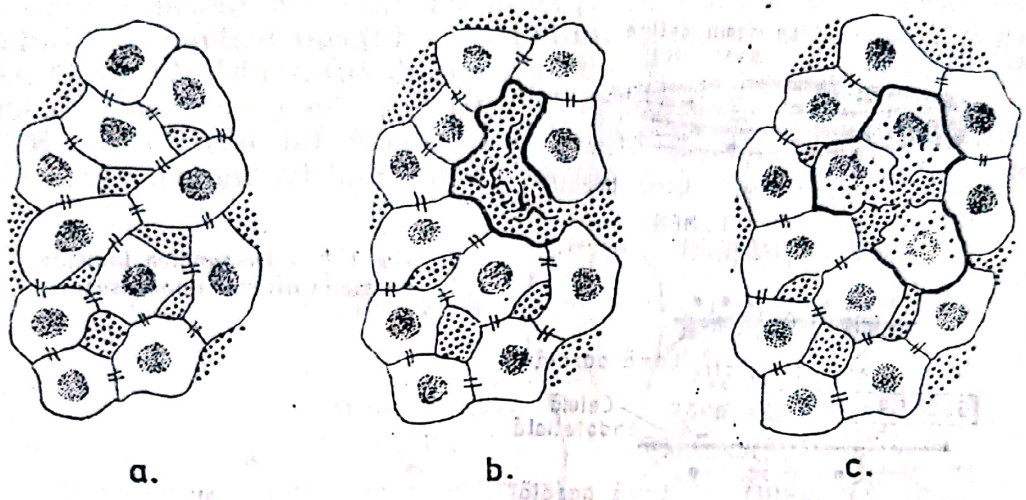


Fig. V. 8 — Mecanismul protecţiei prin Ca^{2+} în cazul lezării tegumentelor: a) ţesut cu o zonă lezată; b) închiderea joncţiunilor permeabile prin efectul Ca^{2+} extracelular; c) refacerea joncţiunilor permeabile.

2.3.2. *Semnalele transmise la distanţă*

În cazul unui *semnal transmis la distanţă* se va interpune „mediul intern" care separă elementele emiţătoare de cele receptoare, uneori foarte departe unele de altele. Între celulele unei glande cu secreţie internă care eliberează produsul lor de secreţie în circulaţia generală şi celulele ţintă capabile să capteze şi să traducă semnalele transmise se interpun următoarele medii: plasma, pereţii vasculari, iar uneori lamele bazale şi matricele conjunctive ale diferitelor organe.

2.3.2.1. *Transferul de substanţe în plasmă*

Transferul de substanţe *în plasmă* nu relevă întotdeauna doar fenomene mecanice. Plasma este, de asemenea, un mediu de maturare a semnalelor şi de reglare a schimburilor. La acest nivel se află, de asemenea, substanţe care modulează raportul celulă-mediu, ca şi proteine plasmatice, specializate în transportul anumitor mesageri, pe care îi acompaniază pînă în spaţiile intercelulare.

2.3.2.2. *Barierele endoteliale vasculare*

Modul în care moleculele mesager străbat *barierele endoteliale vasculare* nu este încă explicat. Este probabilă intervenţia fenomenelor de endocitoză, exocitoză şi transcitoză. Bariera hemato-encefalică poate oferi un model comparativ de studiu, ca structură restrictivă în raport cu permeabilitatea structurilor obişnuite.

2.3.2.3. *Lamelele bazale*

Lamele bazale reprezintă structuri glicoproteice microfibrilare dispuse în jurul organelor, între ţesuturi sau chiar la periferia celulelor izolate (fig. 9).

Scanned with OKEN Scanner

Distribuția lor reflectă funcții multiple de susținere și de schimb. În prezent lamele bazale sînt obiectul unor cercetări minuțioase, deoarece s-a constatat asocierea lor moleculară cu plasmalema, exprimată și în patologie.

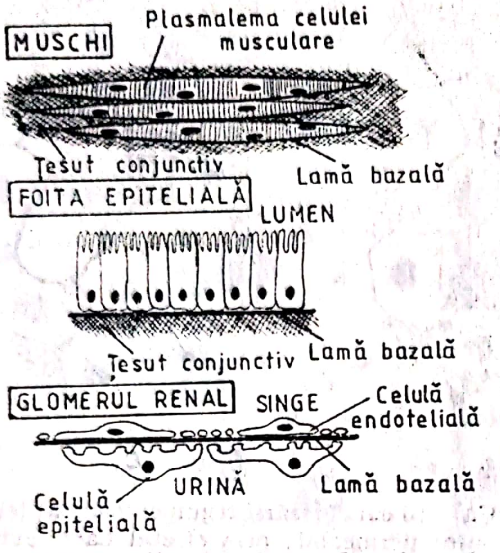


Fig. V.9 — Dispunerea lamelor bazale la nivelul unor țesuturi.

Constituenții membranelor bazale sînt: laminina, colagenul de tip IV, heparan-sulfați, proteoglicani, nidogenul și entactina. Laminina se leagă cu toți acești constituenți, reprezentînd molecula de la bază a matrizomului, în care colagenul IV formează „osatura", iar proteoglicanii liantul intermolecular (52, 73). Deși sînt considerate frecvent ca aparținînd matricei extracelulare, lamele bazale au o individualitate structurală.

Moleculei cruciforme de laminină i se atribuie un rol de prim ordin la nivelul structurii, datorită proprietăților adezive și afinităților sale plurivalente (fig. 10).

Inițial, rolul membranelor bazale în transmiterea mesajelor a fost considerat în sensul unei selecții a elementelor mesagere funcție de masă și sarcina lor electrică. În prezent se consideră că acestea pot fi chiar suport pentru o serie de semnale din spațiile intercelulare.

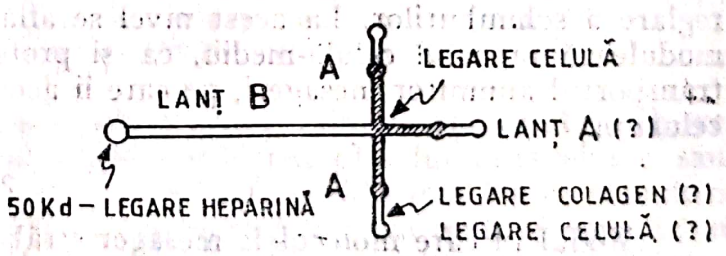


Fig. V.10 — Organizarea globală structurală și funcțională a lamininei. Glicoproteină, cruciformă (G. M 1 000 000 d) laminina prezintă două sau trei lanțuri A și un lanț B, legate prin punți disulfidice. Sînt figurate locurile de legeare la membrana celulară și cu heparina (certe), regiunile de legare cu colagenul nefiind încă detectate precis. Nu se știe dacă lanțul se extinde în toată lungimea proteinei, sau dacă brațul scurt central reprezintă un lanț A distinct (După K. M. Yamada, 1983) (87).

2.3.2.4. *Matricea extracelulară și spațiile intersțiale*

Rețea complexă de macromolecule extracelulare, matricea extracelulară constituie o tramă extrem de structurată, în cadrul căreia celulele pot migra și interacționa unele cu altele (fig. 11). Menținute împreună de matrice, celulele vecine aflate în contact direct sînt frecvent legate prin joncțiuni (53).

Prin intermediul matricei extracelulare, majoritatea celulelor din organism sînt dispuse în țesuturi, în funcție de specializarea lor. Asocierea țesuturilor în organe, unități funcționale de dimensiuni mai mari, se efectuează tot prin intermediul matricei. Alcătuirea și organizarea moleculară a acestei structuri — și implicit funcțiile — constituie obiectul unor cercetări extinse (1, 41, 53, 73, 82). Din motive de concizie, am preferat preluarea unei scheme, destul de sugestivă, a matricei (fig. 11).

Matricea extracelulară constă, în esență, dintr-o rețea de *proteine fibroase* aflate într-un gel hidratat de *polizaharide*. Aceste molecule proteice

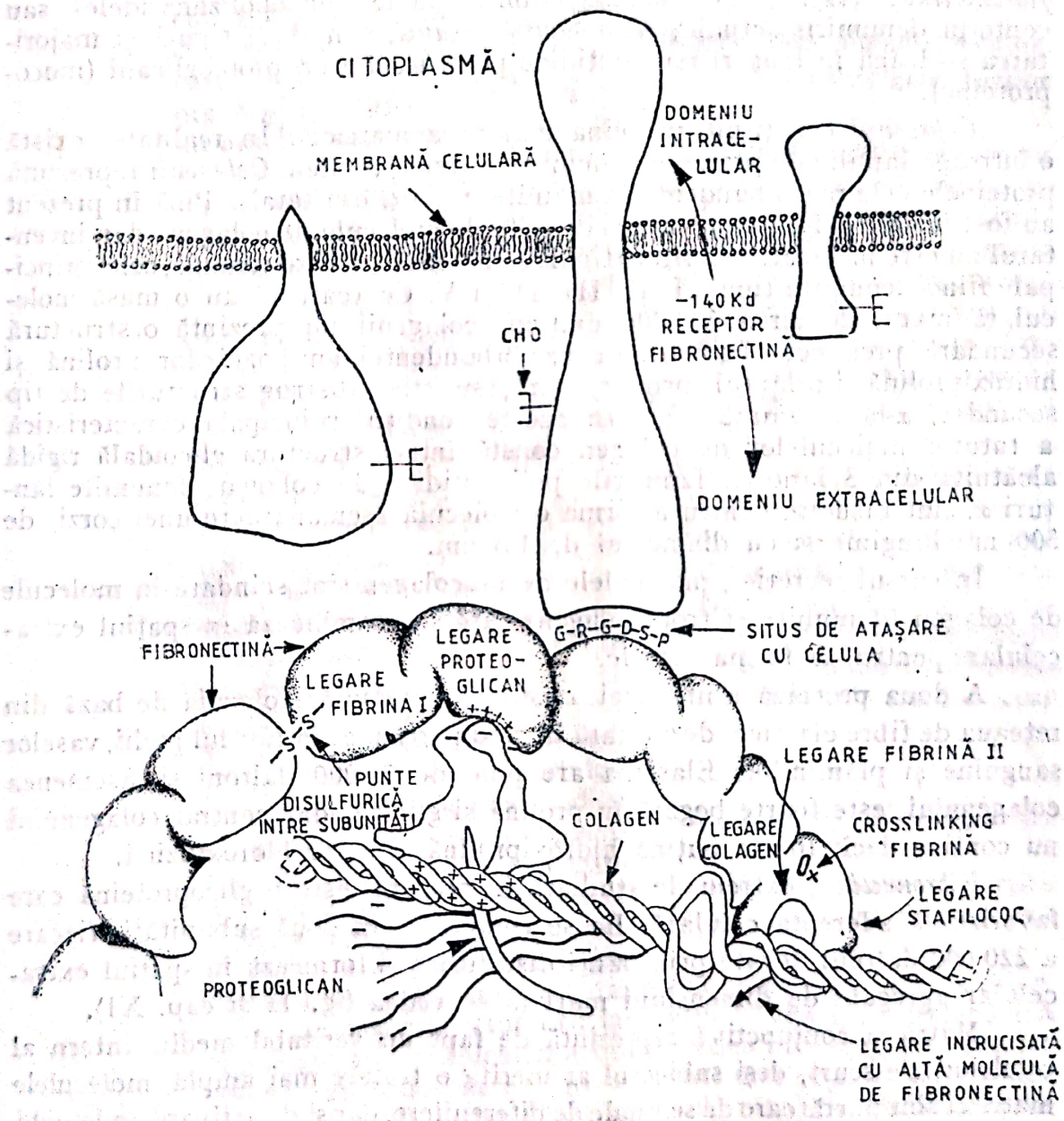


Fig. V. 11 — Reprezentare schematică a organizării matricei extracelulare. Fibronectina interacționează cu moleculele de colagen, proteoglican și cu receptorul de la suprafața celulei prin intermediul situsurilor de legare din diferite zone ale lanțului său polipeptidic (250 000 daltoni). Receptorul celular de suprafață, specific fibronectinei, este o proteină distinctă de celelalte proteine ale membranei plasmatice (După E. Ruoslahti și colab., 1985) (73).

și polizaharidice polivalente sînt secretate local și se asamblează într-o rețea organizată în spațiul extracelular. Primului rol recunoscut al matricei, acela de „clei" biologic universal (1) stabilizator al structurii fizice tisulare, i s-au adăugat, consecutiv cercetărilor din ultimii ani și alte funcții. În esență, matricea joacă un rol activ în reglarea comportamentului celulelor cu care se află în contact, influențîndu-le dezvoltarea, migrarea, porliferarea, forma și funcțiile metabolice (1). Această complexitate funcțională este reflexul compoziției moleculare a matricei extracelulare. Deocamdată, cunoașterea alcătuirii moleculare este fragmentară, îndeosebi în ceea ce privește organizarea spațială a componentelor. Proteinele componente ale matricei sînt: *fibronectina*, *colagenul* și *elastina*. Polizaharidele (mucopolizaharidele), sau conform denumirii actuale, *glicozoaminoglicanii*, sînt de 7 tipuri și majoritatea se leagă în lanțuri polipeptidice pentru a forma proteoglicani (mucoproteine).

Colagenul constituie proteina majoră a matricei. În realitate, există o întreagă familie de proteine denumite cu acest termen. *Colagenii* reprezintă proteinele cele mai abundente la mamifere (25% din total). Pînă în prezent au fost izolate cel puțin 13 tipuri diferite de molecule de colagen, dar inventarul nu este încheiat. Diferitele tipuri se notează cu cifre romane, cele principale fiind denumite tipuri I, II, III, IV și V. Cu toate că au o masă moleculară mare, de circa 300 000 daltoni, colagenii nu prezintă o structură secundară prea complexă, din cauza abundenței aminoacizilor prolină și hidroxiprolină în lanțul primar, care, se știe, distrug structurile de tip secundar, α-helix sau β-pliat. În aceste condiții, principala caracteristică a tuturor moleculelor de colagen constă într-o structură elicoidală rigidă alcătuită din 3 lanțuri. Lanțurile polipeptidice de colagen, denumite lanțuri α, sînt răsucite pentru a forma o moleculă asemănătoare unei corzi, de 300 nm lungime și cu diametrul de 1,5 nm.

În cursul secreției, moleculele de procolagen sînt scindate în molecule de colagen (denumite și tropocolagen) care se asamblează în spațiul extracelular pentru a forma fibrile.

A doua proteină a matricei, *elastina*, reprezintă molecula de bază din rețeaua de fibre elastice, dezvoltată în mod particular la nivelul pielii, vaselor sanguine și plămînilor. Elastina are p.m. de 70 000 daltoni și, asemenea colagenului, este foarte bogată în prolină și glicină, dar contrar colagenului nu conține decît foarte puțină hidroxiprolină și deloc hidroxilizină.

Fibronectina, extrem de studiată în prezent, este o glicoproteină care favorizează aderența celulară. Ea se compune din două subunități, fiecare a 220 000 daltoni, legate prin punți disulfurice și formează în spațiul extracelular agregate de dimensiuni mari (a se vedea fig. 11 și cap. XI).

Matricea conjunctivă reprezintă de fapt un veritabil mediu intern al celulelor. Pe scurt, deși subiectul ar merita o tratare mai amplă, moleculele matricei sînt purtătoare de semnale de diferențiere, dar și de activare, îndeosebi prin intermediul fibronectinei, strîns legată de membrană (73, 82). Semnalele vor declanșa răspunsuri funcționale în celulă. În mod particular informațiile de la nivelul matricei sînt integrate în adeziunea și motilitatea celulelor. Ma-

Scanned with OKEN Scanner

tricea extracelulară nu reprezintă, deci, o simplă structură de tranzit în circuitele multiple ale comunicării intercelulare.

Deoarece în triada moleculă semnal-medii de transfer-celulă receptorii prezintă un rol particular, ne referim la aceștia în secțiunea următoare.

RECEPTORII MEMBRANARI DATE — NORMALE ȘI PATOLOGICE

3.1. Date introductive

Supraviețuirea organismului într-un mediu adesea ostil este condiționată în primul rînd de simultaneitatea de reacție a populațiilor celulare diversificate care îl constituie. Aceste reacții celulare asigură, prin complementaritatea și unitatea lor, menținerea homeostaziei mediului intern-factor esențial pentru desfășurarea normală a proceselor vitale. Coordonarea activităților celulare, controlul diviziunii pentru dezvoltarea armonioasă a celulelor și organizarea lor adecvată în țesuturi, nu sînt posibile decît cu condiția existenței unui elaborat sistem de comunicare intercelulară prin semnale chimice. Aceste semnale sînt reprezentate de molecule care, produse de anumite celule mai mult sau mai puțin specializate, ajung în mediul extracelular de unde își exercită acțiunea asupra altor grupe celulare, determinînd răspunsuri funcționale și/sau structurale coordonate. Aceste molecule sînt denumite hormoni atunci cînd, produse de organe endocrine specializate, intră în circulația generală acționînd asupra unor „ținte" adesea dispersate în tot organismul (insulină, TSH etc.). Cînd molecula-semnal este eliberată de un neuron și, la nivelul unei structuri sinaptice specializate, acționează asupra unui alt neuron sau unei structuri efectoare (mușchi, glandă etc.) se utilizează termenul de neuromediator (acetilcolină, noradrenalină etc.). În fine, atunci cînd substanța chimică produsă influențează doar celulele din zona de eliberare, asigurînd homeostazia sau reacția țesutului sau organului respectiv, se utilizează denumirea de hormon local (histamină, plasmakinine, factori de creștere etc.). Această separare pe categorii distincte a moleculelor cu rol de semnale chimice intercelulare a început în ultimii ani să-și piardă tot mai mult semnificația. Unele substanțe considerate a fi exclusiv hormoni locali s-au dovedit a fi și neuromediatori importanți (histamina, serotonina etc.). Hormonii clasici s-au demonstrat a avea și roluri specializate de neuromodulatori și neurotransmițători sinaptici (insulina, adrenalina). În numeroase sinapse se eliberează simultan două sau chiar mai multe substanțe active dintre care unele, pe lîngă rolul local, exercită și acțiuni generale. S-a descris un adevărat

Scanned with OKEN Scanner

sistem endocrin difuz (APUD), format din celule de origine neurală dispersate practic în tot organismul, capabile să secrete un mare număr de substanțe cu rol în activitatea a numeroase țesuturi și organe (tub digestiv, sistem nervos central și periferic etc.). Datorită acestui fapt, pe măsură ce diferențele se șterg, există astăzi tendința de a reuni aceste substanțe cu rol de semnale intercelulare într-o categorie unică, cea a mesagerilor primari (hormoni în sensul general al cuvîntului).

Capacitatea celulelor de a răspunde la mesajul chimic încorporat în molecula-semnal depinde de prezența în structura celulei-țintă, a unor molecule capabile să recunoască specific mesagerul primar: receptorii. Macromolecule proteice sau glicoproteice, receptorii îndeplinesc exclusiv două funcții care îi fac indispensabili atît vieții celulei căreia îi aparțin cît și supraviețuirii organismului întreg. Dintre aceste funcții, prima constă în recunoașterea din ansamblul substanțelor extracelulare a moleculei de hormon (mesager primar) și realizarea, cu mare afinitate și specificitate, a unei interacțiuni reversibile cu această moleculă *(reacție primară)*. Ca o consecință a reacției primare de recunoaștere, receptorii declanșează o *reacție secundară* care, printr-o suită de etape ulterioare, determină răspunsul celular specific stimului hormonali.

Majoritatea receptorilor destinați recunoașterii mesagerilor primari sînt situați la nivelul membranei celulare. Această dispunere este deosebit de favorabilă avînd în vedere faptul că factorii hormonali sînt, cu rare excepții, substanțe hidrosolubile ce nu pot traversa barierele hidrofobe lipidice din membrană. O excepție o constituie de exemplu hormonii steroizi liposolubili, care se cuplează cu receptorii specifici în mediul intracelular, după ce au traversat membrana.

Conceptul de receptor a fost introdus încă din 1878 de J.N. Langley, care, într-un articol publicat în "Journal of Physiology (London)" privind efectele pilocarpinei și atropinei asupra secreției salivare la pisică, emite ipoteza existenței unor „substanțe receptive" specifice celor doi alcaloizi. În 1905, același autor explică acțiunile antagonice ale nicotinei și curarei asupra transmiterii neuromusculare prin deplasarea mutuală de la nivelul aceleiași „substanțe". Introducerea definitivă a noțiunii de receptor se atribuie lui P. Ehrlich (1910), care, în cursul cercetărilor sale asupra interacțiunii toxinelor și antitoxinelor, emite postulatul „corpora non agunt nissi fixata". Ulterior acest concept a devenit indispensabil pentru a discuta și „înțelege" modul de acțiune al agenților bioactivi. Timp de decenii conceptul de receptor a fost utilizat ca entitate operațională incontestabilă, deși nu exista nici măcar o singură dovadă experimentală concretă cu privire la existența sa. Marea valoare euristică a acestui concept a permis emiterea a numeroase teorii ale recepției. Asocierea sa cu legea acțiunii maselor a oferit baza descrierii cantitative a interacțiunilor dintre agenții bioactivi și receptorii moleculari specifici.

Cunoașterea structurii factorilor hormonali și a proprietăților chimice, împreună cu complementaritatea postulată a acestora cu proprietățile chimice ale zonei de legare de pe molecula receptorului, au permis studiul relațiilor dintre structura chimică și acțiunea substanțelor bioactive. Deși molecula receptoare continua să fie necunoscută, aceste studii au permis descrierea complementară a zonelor sale active, la fel cum cunoașterea cheii unei uși permite cunoașterea, cel puțin parțială, a broaștei căreia îi este destinată (4).

Scanned with OKEN Scanner

După decenii de utilizare a conceptului de receptor și de aplicare a teoriei receptorilor în interpretarea curbelor doză-răspuns, odată cu sinteza unor agenți puternic marcați cu izotopi radioactivi, a devenit posibilă, spre sfîrșitul anilor 60 izolarea și identificarea concretă a moleculelor receptoare. Aceste cercetări au permis izolarea și purificarea extensivă a unor tipuri de receptori. S-a evidențiat o remarcabilă corelație între constantele de afinitate măsurate în țesuturi intacte și constantele de legare obținute pe preparate de receptori purificați (6, 9).

3.2. Interacțiunile ligand-receptor, dinamica receptorilor

În afara interacțiunii cu receptorii, substanțele biologic active (endogene — mesageri primari —, sau exogene — farmacologice etc.) se pot lega și pe alte molecule (de obicei proteine) fără a declanșa reacții secundare. Aceste componente ligand-specifice sînt denumite în general acceptori și reprezintă factori de degradare sau de transport. Receptorii sînt capabili să recunoască specific doar o singură moleculă-mesaj. Între receptor și mesager apare o mulare tridimensională reciprocă realizată prin forțe intermoleculare. Procesul de „recunoaștere" determină modificări ale conformației moleculei receptoare care trece într-o formă activă. Această activare inițiază o secvență de procese ce duc la efectul final.

Între enzimele biochimistului și receptorii fiziofarmacologului există un paralelism strîns. În enzimologie, se face o diferențiere netă între molecula enzimei și „zona activă" implicată în interacțiunea cu substratul. În cazul receptorilor se vorbește de asemenea despre o „zonă receptoare" considerată a fi o diferențiere specifică a moleculei receptoare. La nivelul acesteia se realizează interacțiunea cu întreg mesagerul, dacă acesta are o moleculă de dimensiuni reduse. În cazul în care mesagerul primar este o moleculă de dimensiuni mari (de ex.: polipeptid) interacțiunea „zonei receptoare" are loc doar cu „zona activă" (farmacofor) a moleculei-mesaj.

3.2.1. *Agoniști-antagoniști*

În enzimologie se descriu substraturi (metaboliți) care sînt convertite de enzimă în produși și antimetaboliți-agenți blocanți — care interacționează cu enzima fără a fi convertiți.

O diferențiere oarecum similară se realizează și în cazul receptorilor. În timp ce în organism liganzii naturali ai receptorilor *(agoniști)* declanșează atît reacția primară cît și pe cea secundară (a se vedea mai sus), este posibil să se sintetizeze substanțe care, deși sînt recunoascute de receptori declanșînd reacția primară, nu determină reacțiile secundare de răspuns celular. Aceste substanțe, care împiedică accesul agoniștilor la receptori, reprezintă *antagoniștii competitivi* sau agenți blocanți. Între cele două extreme, agoniști și antagoniști, există un spectru larg de agoniști și antagoniști parțiali ce declanșează răspunsuri de intensitate scăzută.

Scanned with OKEN Scanner

Membrii unei familii de agoniști — care acționează asupra unui receptor comun — pot fi diferiți atît din punctul de vedere al afinității cît și în ceea ce privește activitatea intrinsecă. Activitatea intrinsecă redusă caracterizează agoniștii parțiali ale căror efecte maxime sînt în general mai reduse decît cele ale agoniștilor (4,6). Un agonist parțial pus în prezența unui agonist normal reduce efectul celui din urmă, deplasîndu-l parțial de pe receptorii pe care îi ocupă. Astfel este posibil ca un agonist parțial să acționeze ca un antagonist parțial în funcție de situația în care este pus. Acțiunea agonistului nu poate fi redusă de acest tip de antagonist parțial decît pînă la limita de acțiune caracteristică efectului propriu antagonistului.

3.2.2. *Cinetica interacțiunii ligand-receptor*

Cinetica interacțiunii receptorilor cu liganzii corespunzători reprezintă în ultimă instanță o formă de aplicare a legii acțiunii maselor. Majoritatea modelelor teoretice pot fi condensate la următoarea formă:

$$L + R \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} LR \underset{K_{-2}}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} LR^* \underset{K_{-3}}{\overset{K_3}{\rightleftharpoons}} L + R^* \underset{K_{-4}}{\overset{K_4}{\rightleftharpoons}} R \underset{K_{-5}}{\overset{K_5}{\rightleftharpoons}} R$$

în care L este ligandul, R — receptorul inactiv, R* — receptorul în stare activă și R — receptorul într-o stare nereceptivă posibil regenerativă (5,6). Constantele de echilibru care guvernează cantitățile relative de receptor în diferite stări sînt astfel definite încît $K_1 = K_{-1}/K_1$.

Activarea receptorului în cursul ocupării sau după ocupare („coliziune în trecere") sînt reprezentate de LR* și R*. Pentru agoniști constantele de rată K_1, K_2 și, posibil, K_3 sînt relativ mari, iar K_{-2} foarte redus. În cazul agoniștilor K_2 are valori foarte scăzute, ceea ce implică o ocupare reversibilă a receptorilor (LR) neurmată de activare. Activitatea intrinsecă este dependentă în special de raportul K_2/K_{-1}, care determină fracția de receptori ocupați care trece în stare activată (LR* și/sau R*). Trecerea în starea R deactivată și refractară implică așa-zisul „consum" de receptor. Acesta este precedat în unele cazuri de agregarea și internalizarea (endocitară) receptorilor membranari, urmată de digestia lor intracelulară (59, 20, 75).

3.2.3. *Dinamica receptorilor*

Majoritatea receptorilor implicați în comunicarea intercelulară sînt structuri proteice ce se află pe, sau mai degrabă plutesc, în membrana celulară. Receptorii intracelulari din citoplasmă și organite sînt implicați atît în comunicarea intercelulară (hormoni steroizi) cît și în transferul intracelular de informație (de ex. zonele active ale unor enzime).

Apariția în mediul extracelular a semnalelor chimice specifice și cuplarea acestora cu receptorii determină fenomene moleculare cu o dinamică surprinzător de complexă. Aceste fenomene nu pot fi explicate decît dacă se acceptă ideea unei mobilități deosebite a structurii receptoare („conceptul receptorului mobil") (46). Activarea receptorilor membranari presupune o serie de fenomene de migrare și agregare moleculară a căror diversitate este încă departe

Scanned with OKEN Scanner

de a fi cuprinsă și cu atit mai puțin explicată. Din această categorie ar face parte, de exemplu, migrarea laterală și apariția unor adevărate aglomerate (*„clusters"*) de receptori în zonele activate ale suprafeței celulei țintă. În unele cazuri receptorii nu sînt alcătuiți din proteine solitare ci din agregate moleculare ale căror subunități plutesc separat în membrană. Activarea în aceste situații presupune fenomene de migrare laterală, coliziune și agregare în complexe moleculare receptoare active conținînd și subunități cu rol de canal ionic. Adesea activarea receptorului nu este urmată de răspunsul intracelular decît dacă receptorul activat se agregă cu proteine regulatoare ce plutesc de asemenea liber în membrană.

Dealtfel și receptorii citoplasmatici au un grad important de mobilitate. De exemplu receptorii steroidici activați migrează din citoplasmă în nucleu, acționînd la acest nivel ca derepresori pentru anumite gene (70). Numărul receptorilor de un anumit tip din membrana unei celule țintă este variabil. Frecvent, deactivarea receptorilor este urmată de o internalizare și degradare biochimică. Permanent se sintetizează noi receptori care, aduși în membrană, mențin capacitatea de răspuns a celulei la un anumit agonist.

În condiții de echilibru, numărul receptorilor (R) este determinat de raportul dintre rata de regenerare sau sinteză a receptorilor și rata de consum. În prezența unor concentrații mari de agoniști sau liganzi naturali, rata de dezactivare crește și, prin formarea crescută a receptorilor refractari, crește rata de consum. Această reducere a numărului de receptori disponibili prin exces de agoniști este cunoscută sub denumirea de reglare omologă (homospecifică) inhibitoare (reductivă, descendentă). Protecția receptorilor împotriva activării și prin aceasta reducerea consumului de receptori, de ex. prin aplicare de blocanți sau antagoniști competitivi sau denervare, declanșează reglarea omologă activatoare (ascendentă). Aceste modificări ale capacității (numărului de receptori) au fost descrise în numeroase studii și sînt utilizate în explicarea fenomenelor de toleranță obținute prin aplicarea unor doze mari de agonist sau a fenomenelor de *rebound* și a sindromului de privare, observate în cazurile aplicării unor blocanți sau a hipersensibilității de denervare (60, 77).

Capacitatea sistemului receptor poate fi crescută și sub influența unor agenți bioactivi cu activare indirectă — reglare heterologă (heterospecifică). Astfel se explică creșterea densității receptorilor la ocitocină în miometrul expus acțiunii estrogenilor și reducerea acestui număr după progesteron (78), sau creșterea numărului de beta-adrenoreceptori sub influența hormonilor tiroidieni (60). Aceste fenomene explică variațiile sensibilității țesuturilor la ocitocină și, respectiv, noradrenalină.

Frecvent, pentru stimularea maximă a efectorului este necesar ca doar o parte dintre receptorii disponibili să fie ocupați. Există prin urmare o „rezervă" de receptori care variază în funcție de caracteristicile cuplării receptor-efector. Cu cît de exemplu, treptele intermediare au o capacitate de amplificare mai mare, cu atît „rezerva" crește. Rezerva de receptori variază în funcție de tipul de țesut, precum și de starea funcțională a acestora (54).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.4. *Diferențierea receptorilor*

În enzimologie sînt descrise izoenzimele, care, interacționînd cu același substrat, diferă prin afinitate și viteza interacțiunii cu acesta. În cazul receptorilor există de asemenea o subclasificare. Pentru aceeași moleculă-mesaj, naturală coexistă în organism mai multe tipuri și subtipuri de receptori, răspunsul celular la semnalul chimic depinzînd de tipul de receptor cuplat. Astfel se explică de ce, în teritorii diferite, același hormon este capabil să inducă răspunsuri aproape diametral opuse, ce reprezintă expresia funcțională a interacțiunii hormonului cu tipul de receptori ce predomină în teritoriul respectiv. Prima dovadă în favoarea existenței unor adevărate „familii" de receptori a fost adusă de Ahlquist (1948), (3) în binecunoscuta sa clasificare a receptorilor adrenergici în două categorii: alfa și beta. Astăzi această clasificare s-a extins considerabil, incluzînd tipurile $alfa_1$, $alfa_2$, $beta_1$ și $beta_2$. Acetilcolina eliberată din terminațiile nervoase poate acționa fie asupra receptorilor nicotinici (N) fie asupra receptorilor muscarinici (M). Există cel puțin două tipuri de receptori dopaminergici (D_1 — și D_2) sau 3 tipuri pentru endorfine (miu, delta și kappa) etc.

Evident, pluralitatea receptorilor destinați unui agonist are atît o importanță fiziologică, modulînd adecvat răspunsul celular la un anumit semnal chimic, cît și o importanță farmacologică, permițînd sinteza unor agoniști de mare specificitate capabili să exercite acțiuni terapeutice de mare selectivitate. Este de menționat în acest sens un exemplu edificator. Receptorii $beta_1$, majoritari în miocard, controlează contracția acestuia, în timp ce receptorii $beta_2$ predomină în teritoriul bronșic controlînd relaxarea acestora. La astmatici contracția bronșică ar putea fi rezolvată simplu administrînd noradrenalină, agonistul natural al receptorilor menționați. Din păcate această cură nu poate fi utilizată datorită efectelor cardiace secundare indezirabile determinate de agonistul natural care este recunoscut și de receptorii $beta_1$ cardiaci. Faptul că cei doi receptori sînt diferiți a permis selecționarea unor agoniști de sinteză cu acțiune predominantă pe receptorii de tip $beta_2$, a căror utilizare în tratarea astmului sub formă de aerosoli este eficientă și larg răspîndită (de ex: salbutamolul).

3.3. Mecanismele răspunsului celular declanșat de activarea receptorilor

În funcție de localizarea receptorilor și timpul de declanșare, reacțiile hormonale specifice pot fi de cel puțin trei tipuri (fig. 12).

— *Relațiile de ordinul milisecundelor* sînt caracteristice acțiunii neuromediatorilor sinaptici; de exemplu acetilcolina eliberată din terminațiile nervoase colinergice la nivelul fibrelor musculare scheletice (placa motorie). Acționînd asupra receptorilor membranari postsinaptici, mediatorul modifică permeabilitatea de membrană și determină un potențial de acțiune la acest nivel.

— *Reacțiile de ordinul secundelor* ating un maximum în interval de cîteva minute. În acest caz receptorii au de asemenea o localizare membra-

Scanned with OKEN Scanner

nară, dar procesul presupune producerea unui mesager intracelular (al II-lea mesager), care determină realizarea acțiunii celulare a semnalului chimic extracelular (întîiul mesager). Funcția de al doilea mesager s-a atribuit

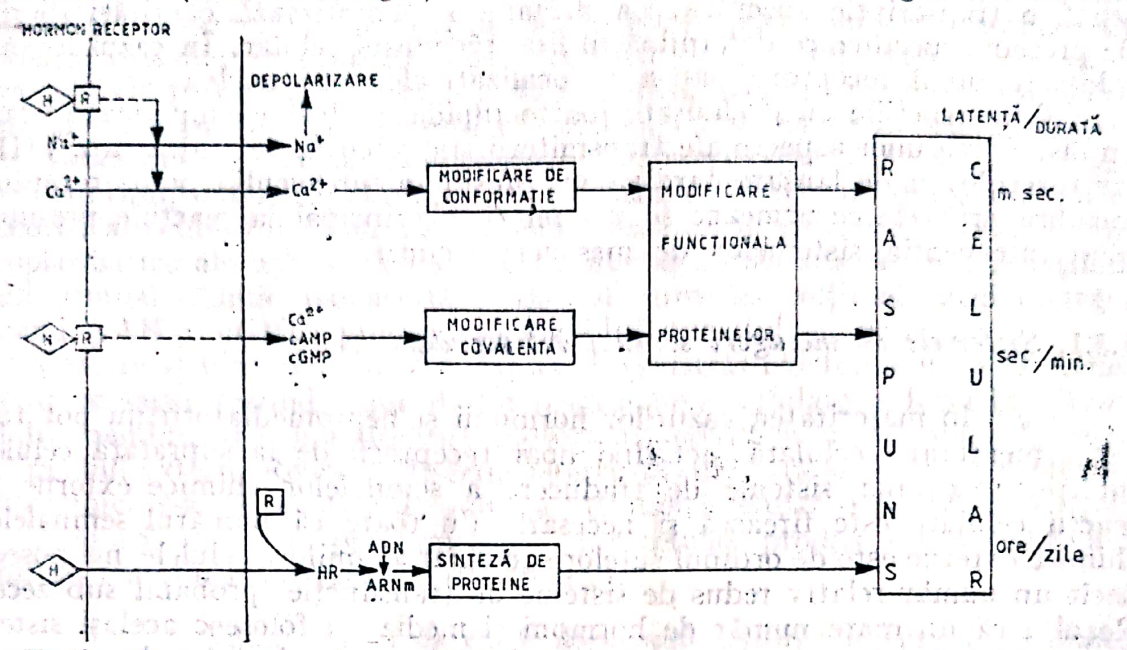


Fig. V. 12 — Tipuri de reacții hormonale după localizarea receptorilor și timpul de declanșare.

pînă în prezent unor nucleotide ciclice (3′ — 5′ cAMP și 3′ — 5′ cGMP), ionilor de calciu, unor produși de degradare a fosfatidil inozitolului (diacilglicerolul și inozitol trifosfatul), nefiind exclusă și participarea altor substanțe sau procese biochimice cu același rol. Acțiunea acestor mesageri secunzi s-ar realiza în principal prin activarea proteinchinazelor intracelulare specifice, care, la rîndul lor, ar crește fosforilările proteice. Modificarea funcțională astfel indusă ar determina relativ rapid răspunsul celular.

Reacțiile cu declanșare tardivă (de ordinul orelor) în care receptorii nu sînt localizați la suprafața membranei ci în interiorul celului (fig. 13). În

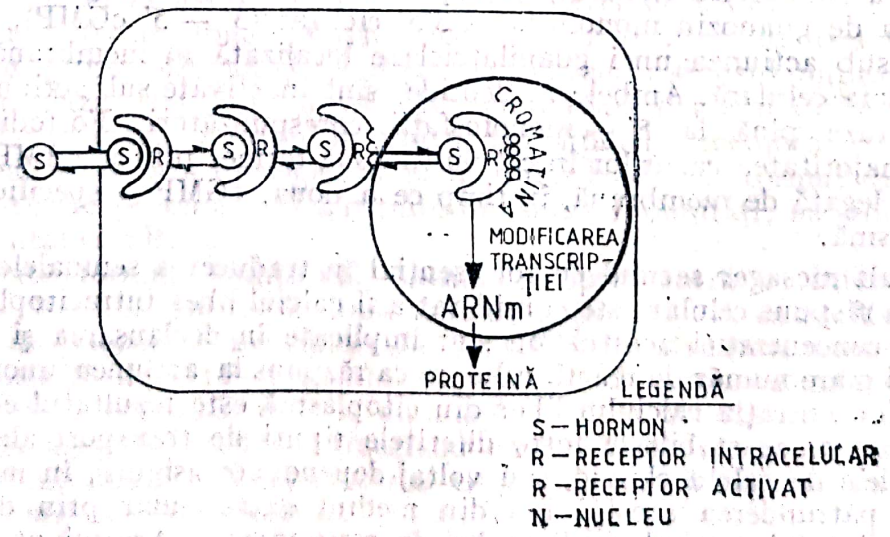


Fig. V. 13 — Reprezentare schematică a etapelor unei reacții hormonale cu declanșare tardivă.

acest caz, factorul hormonal (liposolubil ca în cazul hormonilor steroizi) traversează membrana celulară și acționează asupra receptorilor citoplasmatici. Complexul hormon-receptor este transportat în nucleu unde declanșează o transcripție specifică. Ca urmare, se sintetizează cantități sporite de proteine specifice ce determină în fine răspunsul celular. În cazul hormonilor tiroidieni receptorii par a fi localizați chiar pe nucleu.

Cum reacțiile cu declanșare foarte rapidă au fost exemplificate odată cu discutarea unor aspecte ale transmiterii sinaptice (a se vedea cap. VIII), iar reacțiile cu declanșare tardivă nu presupun intervenția unor receptori membranari, cele ce urmează se vor referi în principal la reacțiile presupunînd intervenția sistemelor de mesageri secunzi.

3.3.1. *Sistemele de mesageri secunzi intracelulari*

Cum în majoritatea cazurilor hormonii și neuromediatorii nu pot traversa membrana celulară, activînd doar receptorii de la suprafața celulei, interpunerea unor sisteme de traducere a semnalelor chimice externe în reacții celulare este firească și necesară. Cu toate că numărul semnalelor chimice externe este de ordinul sutelor sau chiar al miilor, celulele nu posedă decît un număr relativ redus de sisteme de transducție (probabil sub zece). Rezultă că un mare număr de hormoni și mediatori folosesc același sistem de transducție pentru a genera răspunsul celular, fapt deosebit de avantajos pentru economia celulară.

Unul dintre mecanismele traductoare cele mai răspîndite și mai bine cunoscute pînă în prezent este sistemul adenilciclazic. Cercetînd mecanismele de activare adrenergică a fosforilazei hepatice implicate în glicogenoliză, Rall și Sutherland (69) au identificat în 1958 un compus micromolecular-adenozin monofosfatul 3′ — 5′ ciclic — care, produs de membranele celulei hepatice în momentul cuplării noradrenalinei cu receptorii beta, activează enzima menționată. 3′5′ cAMP se formează din ATP sub acțiunea unei enzime membranare adenilatciclaza. Curînd după descoperirea și descrierea cAMP, un alt nucleotid ciclic a fost implicat în sistemul mesagerilor secunzi Este vorba de guanozin monofosfatul 3′5′ ciclizat (3′ — 5′ cGMP), rezultat din GTP sub acțiunea unei guanilatciclaze localizată în membrană dar și în citoplasma celulară. Ambele nucleotide sînt inactivate sub acțiunea unor fosfodiesteraze pînă la 5′ — monofosfații corespunzători. Fosfodiesteraza apare în majoritatea cazurilor în cel puțin două forme: prima, cAMP — specifică este legată de membrană, în timp ce a doua, cGMP — specifică apare în citoplasmă.

Un alt mesager secund cu rol esențial în traducerea semnalelor extracelulare în răspuns celular este considerat a fi calciul liber intracitoplasmatic. Variațiile concentrației acestui ion sînt implicate în declanșarea și desfășurarea unui mare număr de reacții celulare ca răspuns la acțiunea unor stimuli externi. Concentrația calciului liber din citoplasmă este rezultatul echilibrului complex ce se stabilește între diferitele tipuri de transport ale acestui ion. Canalele de calciu chimic, sau voltaj-dependente asigură, în momentul activării, pătrunderea acestui ion din mediul extracelular prin difuziune pasivă realizată în sensul gradientului de concentrație. Acestui proces i se asociază și mecanismele eliberării calciului legat din depozitele intracelulare

Scanned with OKEN Scanner

(mitocondrii, reticul endoplasmic etc.). În sensul scăderii concentrației de Ca^{2+} acționează sistemele de transport activ (pompe de calciu), care fie că asigură extruzia calciului spre mediul extracelular, fie că realizează recaptarea Ca^{2+} în depozite. La acestea se adaugă și mecanisme membranare de extruzie pasivă prin contratransport de Na^{+} din mediul extern, precum și fixarea Ca^{2+} pe grupări chimice și molecule cu afinitate mare pentru acești ioni. Este de menționat și faptul că, pentru activarea unor reacții celulare este suficientă realizarea unei creșteri a concentrației Ca^{2+} doar în unele zone sau compartimente limitate din citoplasmă. Caracterul complex și multifactorial al echilibrului calcic intracelular face ca modificările concentrației citoplasmatice ale acestui ion să fie nu numai consecința directă a acțiunii unui semnal chimic extracelular, dar și urmarea acțiunii altui mesager secund (cAMP, cGMP, produși de fosfatidil inozitol etc.).

Date relativ recente (14, 39, 58) au demonstrat existența unui al treilea tip de mesager secund rezultat din reacția de degradare a fosfatidil inozitolului membranar sub acțiunea receptorului activat de unele molecule-mesaj din mediul extern. Reacția, descrisă pentru prima oară în cazul receptorilor muscarinici, s-a demonstrat a declanșa răspunsul celular și pentru alte tipuri de receptori, iar principalul mesager intracelular produs s-a dovedit a fi inozitol trifosfatul (detalii în continuare).

3.3.2. *Tipuri de efecte hormonale asupra mesagerilor secunzi*

Efectul indus de un mesaj chimic extracelular asupra sistemului de mesageri secunzi depinde de caracteristicile funcționale ale receptorului activat. În funcție de tipul și subtipul de receptori din membrana celulei-țintă, un același hormon poate induce o largă gamă de răspunsuri la nivelul sistemelor de mesageri secunzi. Mai bine cunoscute sînt mecanismele ce determină creșteri sau scăderi ale producerii de cAMP, creșteri ale formării de cGMP, creșteri sau scăderi directe sau indirecte ale concentrației calciului liber intracelular, reacții de degradare ale fosfatidil inozitolului membranar etc.

3.3.2.1. *Stimularea hormonală a formării ae cAMP*

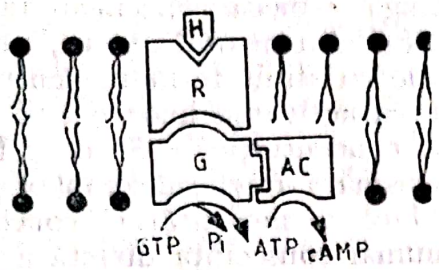
Se consideră astăzi că declanșarea sintezei de cAMP ar fi în general rezultatul activării unui complex membranar format din trei subunități: receptorul propriu-zis, un element proteic traductor și o subunitate catalitică (adenilatciclaza) (fig. 14). Receptorii membranari și adenilatcilaza sînt proteine diferite care „plutesc" în stratul fosfolipidelor membranare. Cuplarea lor se realizează prin intermediul elementului traductor format din proteine Gs(Gi). Aceste proteine sînt alcătuite din două subunități: subunitatea beta și subunitatea alfa-s.

Odată format, complexul hormon-receptor intră în interacțiune cu proteina Gs și disociază cele două subunități (fig. 15). Această disociere este însoțită de înlocuirea unei molecule de GDP din structura proteinei alfa-s cu o moleculă de GTP disponibilă în celulă. Subunitatea alfa-s încărcată cu GTP va interacționa ulterior cu adenilatciclaza activînd-o și determinînd sinteza mesagerului secund intracelular cAMP. Dacă receptorii sînt specifici unui anumit mesaj chimic, proteina Gs și adenilatciclaza nu sînt specifice unui anumit tip de receptor.

Este de subliniat faptul că procesele descrise nu sînt independente de mediul fosfolipidic membranar în care se realizează. Unele date experimentale

Scanned with OKEN Scanner

au demonstrat de exemplu faptul că în recepția și transducția semnalelor chimice ar putea juca un rol procesele de metilare a fosfolipidelor din membrană (fig. 16).



LEGENDA
—MOLECULĂ DE FOSFOLIPID
H—HORMON
R—SUBUNITATE RECEPTOARE
G—SUBUNITATE TRADUCTOARE
AC—SUBUNITATE CATALITICĂ
Pi—FOSFAT ANORGANIC

Fig. V. 14 — Subunitățile complexului receptor membranar (reprezentare schematică).

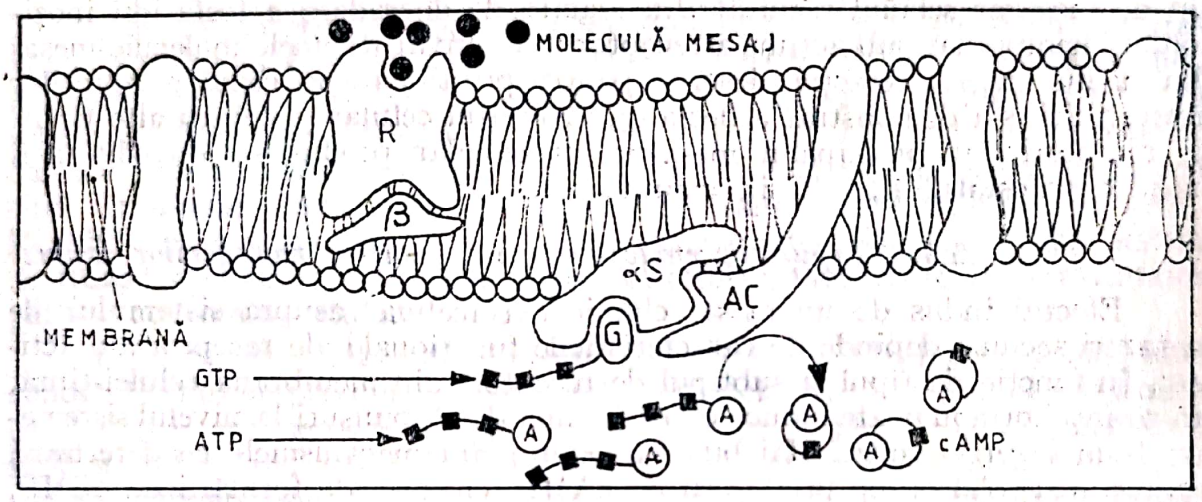
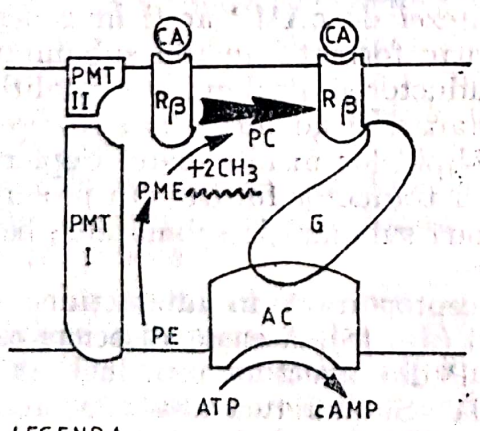


Fig. V. 15 — Mecanismul producerii mesagerului secund (cAMP) în urma activării receptorului cuplat cu subunitatea beta a proteinei G_3. Subunitatea alfa$_3$, cuplînd GTP, activează adenilatciclaza membranară (AC).



LEGENDA
CA – CATECOLAMINĂ
Rβ – RECEPTOR β – ADRENERGIC
PE – FOSFATIDIL ETANOLAMINĂ
PME – FOSFATIDIL MONO–METILETANOAMINĂ
PMT – FOSFOLIPID METIL TRANSFERAZĂ
PC – FOSFATIDIL COLINĂ
~ – CRESTEREA FLUIDITĂȚII
AC – ADENILATCICLAZĂ
G – FACTORUL DE CUPLARE ADENILATCICLAZĂ

Fig. V. 16 — Rolul proceselor de metilare a fosfolipidelor membranare în recepția semnalelor intercelulare. Interacțiunea hormonului cu receptorul activează fosfolipidmetiltransferazele din apropiere. Fosfolipidele metilate sînt translocate (PE convertită în PC trece de pe fața citoplasmatică a membranei pe fața externă) determinînd creșterea fluidității membranei și mărind mobilitatea laterală a receptorului. Subunitatea receptoare poate astfel bascula și intra în coliziune cu adenilatciclaza de pe fața internă. Activarea adenilatciclazei determină formarea de cAMP.

3.3.2.2. *Blocarea hormonală a formării de cAMP*

În afara receptorilor ce determină stimularea formării de cAMP, s-au descris și receptori capabili să inhibe adenilatciclaza reducînd astfel producerea de cAMP. În cazul acestui efect, elementul traductor interpus între receptor și adenilatciclază este o altă proteină de cuplaj Gi. Această proteină este constituită din aceeași subunitate beta ca în cazul proteinei Gs, la care se adaugă o subunitate alfa diferită, descrisă sub denumirea de alfa-i cu efect blocant asupra adenilatciclazei membranare. Trebuie menționat și faptul că, în cazul unor receptori (de ex. insulinici), activarea hormonală determină o creștere a activității unei fosfodiesteraze, care, accelerînd degradarea cAMP, reduce și pe această cale sinteza mesagerului secund.

3.3.2.3. *Creșterea conținutului în cAMP sub acțiunea mesajelor extracelulare*

Al doilea nucleotid ciclic implicat în realizarea funcției de mesager secund a semnalelor din mediul extern este cGMP. Mecanismul traductor prin care receptorii activați devin capabili să activeze, la rîndul lor, guanilatciclaza responsabilă de formarea cGMP este puțin cunoscut. Cum hormonii care determină creșteri ale cGMP determină concomitent și creșteri ale concentrației calciului ionic intracelular (fig. 17), se presupune că ionii de calciu ar putea activa indirect guanilatciclaza citosolică (II). Una dintre ipotezele avansate ar fi cea conform căreia ionii de calciu ar declanșa eliberarea de acid arahidonic cu formare de endoperoxizi (prostaglandine), care, sub acțiunea unei lipooxigenaze, ar trece în forme intermediare cu eliberare de hidrooxiderivați și radicali OH. Aceștia din urmă ar activa guanilatciclaza determinînd formarea de cGMP.

3.3.2.4. *Scăderea conținutului în cGMP sub acțiunea mesajelor extracelulare*

În cursul unor cercetări relativ recente privind mecanismele fotorecepției s-a descris, la nivelul celulelor cu bastonașe din retină, existența unei a treia proteine de cuplaj GTP — dependente, denumită de autori transducină (21). Ca și proteinele Gs și Gi, transducina este formată din aceeași subunitate beta legată de o subunitate alfa diferită — alfa T. Această proteină asigură transformarea unui semnal fizic (fotonii) într-un mesaj secund intracelular. Fotonii absorbiți de retinolul din structura rodopsinei determină transconformarea acestuia și a întregului complex cu opsina. Într-o etapă ulterioară se activează transducina, care, acționînd asemănător cu proteinele G, activează o fosfodiesterază care hidrolizează specific cGMP, determinînd scăderea concentrației de cGMP ca mesager secund. Cum cGMP menține deschise unele canale de Na^+ din membrana bastonașelor, scăderea concentrației sale duce la închiderea acestor canale și modificări ale potențialului de membrană. Astfel iau naștere potențiale de receptor capabile să modifice activitatea neuronilor retinieni și prin aceasta să determine transmiterea mesajelor spre centrii vizuali.

Scanned with OKEN Scanner

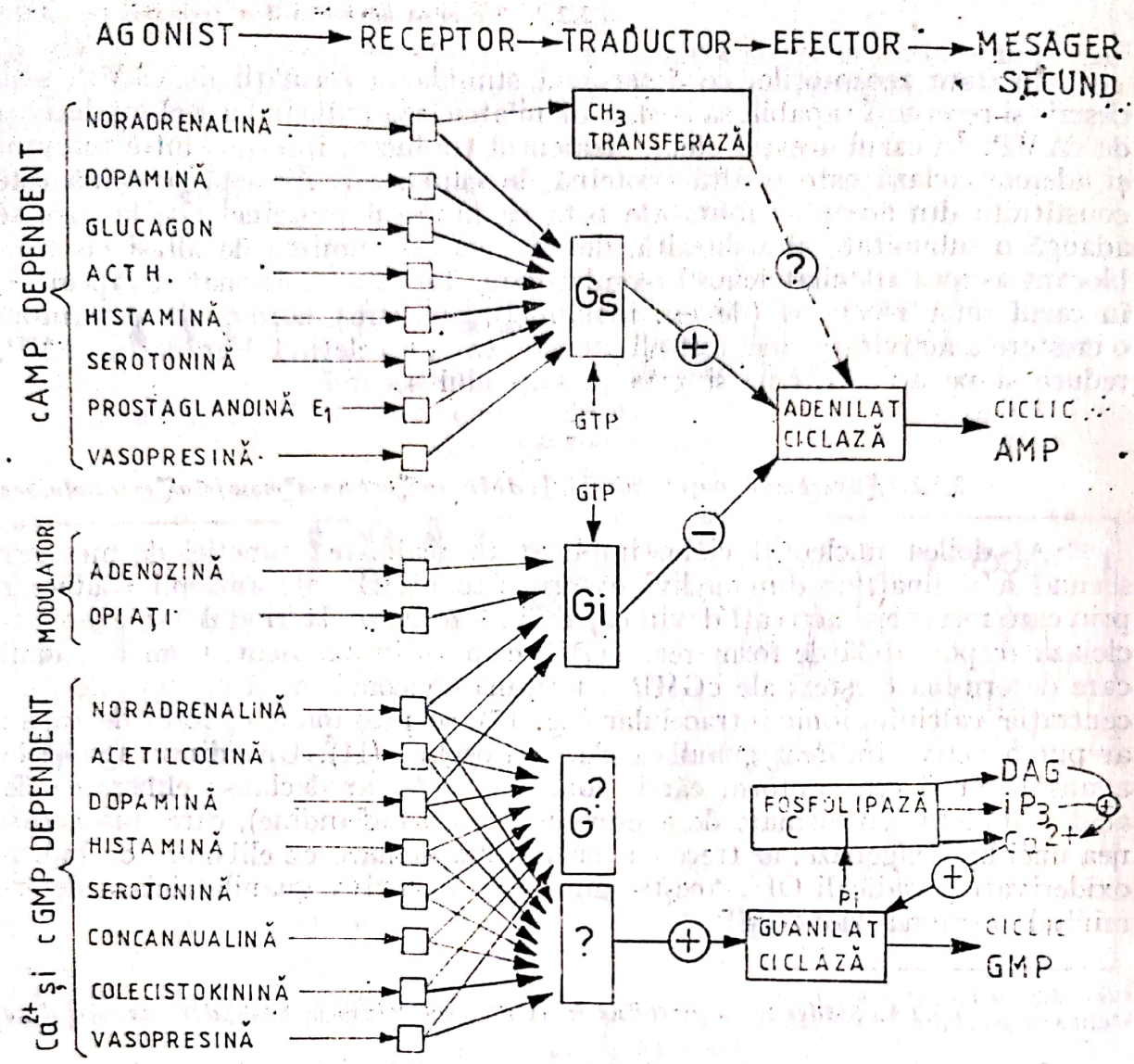


Fig. V. 17 — Căi posibile de generare a mesagerilor secunzi.

3.3.2.5. *Degradarea fosfatidil inozitolului membranar*

Un alt sistem de transducție intracelulară a semnalelor din mediu ce atrage în mod deosebit atenția în ultima perioadă, este cel care utilizează fosfatidil inozotolul (PI), ca precursor pentru a genera cel puțin doi dacă nu mai mulți mesageri secunzi (12, 13). Caracteristica acestui mecanism este multiplicitatea semnalelor de ieșire care mărește enorm versatilitatea sa și il face deosebit de adaptabil la funcția de control a numeroase procese celulare.

PI se deosebește de restul fosfolipidelor membranare prin faptul că poate fi fosforilat suplimentar. Sub acțiunea unei chinaze specifice el este fosforilat în poziția 4 a inelului inozitolic formînd PI-4-fosfatul (PI-4P), care, sub acțiunea unei alte chinaze suferă o a doua fosforilare din care rezultă PI-4,5 difosfatul (PI-4,5 P_2). Acesta este precursorul direct utilizat de mecanismul receptorilor pentru formarea de mesageri secunzi.

Cînd semnalul extern se fixează pe receptorul adecvat (fig. 18) este activată în membrana celulară o enzimă lipolitică-fosfolipaza C (PLC), capabilă

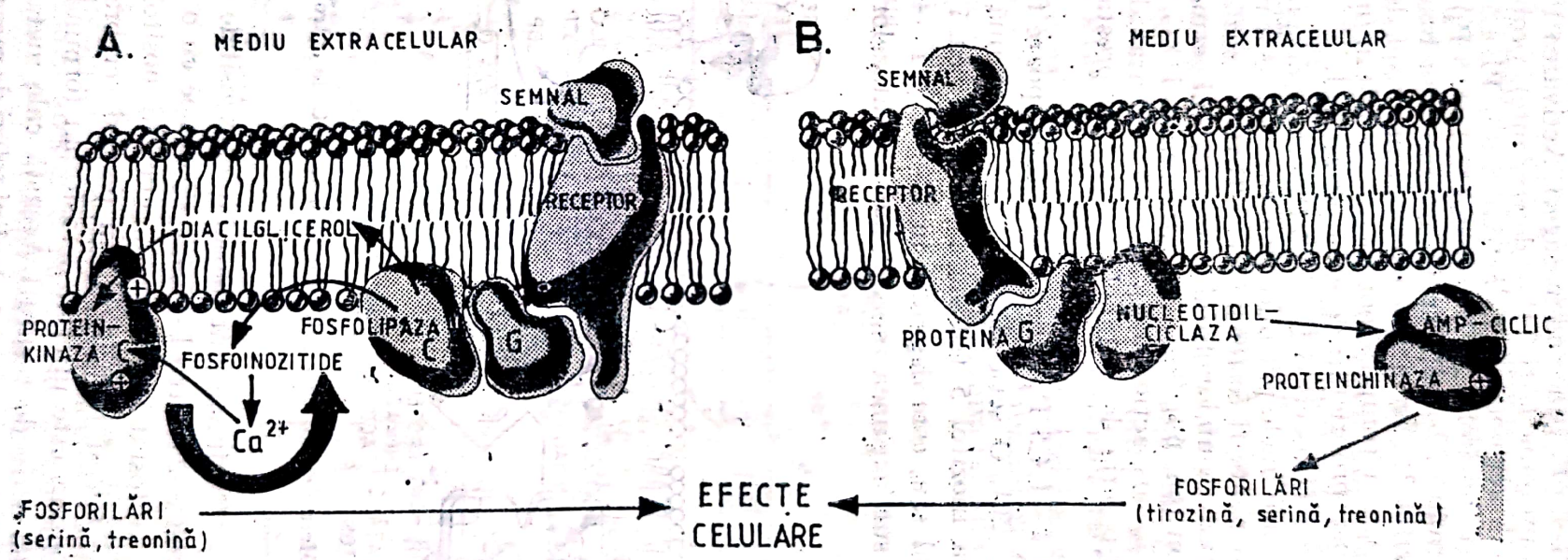


Fig. V. 18 — Reprezentarea comparativă a celor două mecanisme principale implicate în formarea de mesageri secunzi: A. Degradarea fosfatidilinozitolului; B. Formarea de cAMP.

să acționeze asupra PI-4,5 P_2 generînd mesageri. Activarea PLC se realizează prin intermediul unei proteine G (GTP — dependente), probabil, ca în cazul cAMP (34, 39, 56). Sub acțiunea PLC activate, din PI-4,5 P_2 se formează diacylglicerol (DAG) și inozitol 1, 4, 5-trifosfat (I-1, 4, 5 P_3). Această reacție este un mecanism hidrolitic. Ionul hidroxil necesar este luat fie din apă fie chiar din inozitol (poziția 2). În ultima variantă produsul de reacție conține un fosfat ciclic (85). Ambii compuși pot apărea simultan *in vitro*, compusul ciclic avînd de asemenea proprietăți de mesager secund.

Odată formați, atît DAG cît și I—1,4,5 P_3 sînt rapid preluați de diferite căi metabolice, dintre care unele pot duce la generarea altor mesageri chimici. Diacilglicerolul (DAG) poate fi fosforilat de o DAG-chinază generînd acidul fosfatidic, care acționează ca un ionofor de Ca^{2-}, mărind permeabilitatea membranei pentru acest ion (66, 69) (fig. 19). Alternativ, DAG poate fi utilizat ca substrat de o lipază, care acționează eliberînd acid arahidonic, ce poate fi convertit ulterior într-o serie de metaboliți incluzînd prostaglandine, leukotriene și tromboxani.

La rîndul său și I—1,4,5 P_3 eliberat în citosol poate fi metabolizat pe două căi diferite (fig. 20). O serie de fosfataze determină o defosforilare gradată. Sub acțiunea inozitol 5 trifosfatazei se formează I—1,4 P_2 total inactiv, care, la rîndul său, este degradat în I—1 P și I—4 P de o inozitol difosfatază. În final, sub acțiunea inozitol monofosfatazelor specifice se eli-

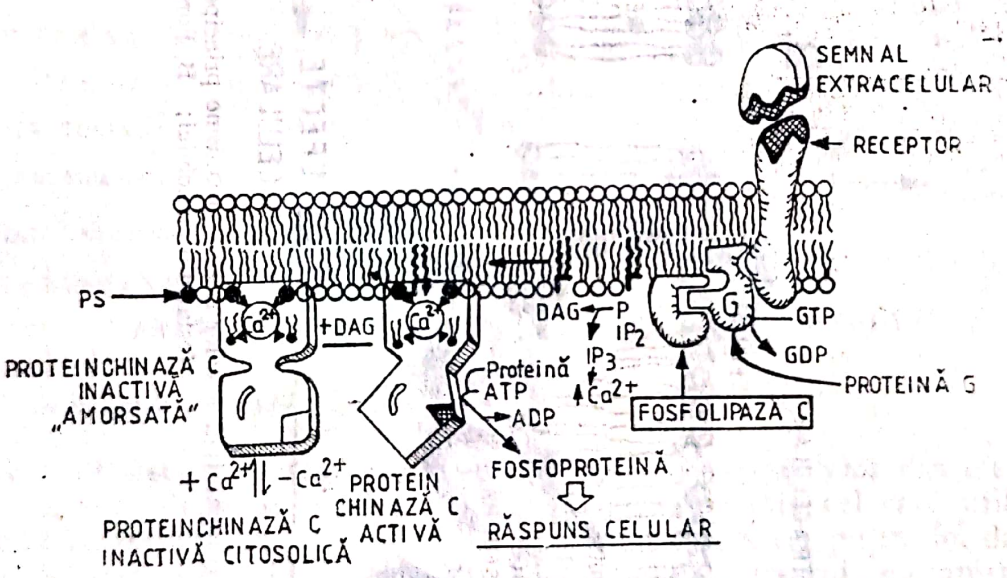


Fig. V. 19 — Mecanismele activării proteinchinazei C de către DAG.

berează inozitolul liber. Enzimele sînt deosebit de sensibile la litiu (15, 80). Calea metabolică alternativă pentru I—1,4,5 P_3 începe cu o inozitol trifosfat 3-chinază care adaugă un fosfat în poziția 3, generînd inositol 1, 3, 4, 5 tetrafosfatul (I—1,3,4,5 P_4) recent identificate în țesutul cerebral (44, 7) și alte țesuturi (37). Acest compus este ulterior defosforilat formînd I—1,3,4, P_3 de asemenea descris într-o serie de țesuturi Această cale metabolică pare a fi importantă întrucît ambii derivați par a îndeplini roluri de mesageri secunzi (15).

Scanned with OKEN Scanner

În condiţii de repaus, majoritatea calciului intracelular se află în formă legată, inactivă la nivelul depozitelor din diferite organite celulare (reticul endoplasmic, mitocondrii etc.). Din acest motiv, concentraţia ionului liber din citoplasmă nu depăşeşte concentraţia de 10^{-7}M. Sub acţiunea a numeroase semnale chimice extracelulare are loc o creştere importantă a acestei concentraţii, moment în care ionul îndeplineşte funcţii de mesager secund, declanşind diverse reacţii celulare (contracţie, secreţie etc.). În general, atingerea şi depăşirea concentraţiei de 10^{-5}M este considerată a fi momentul semnificativ pentru declanşarea majorităţii activităţilor celulare controlate.

Creşterea concentraţiei Ca^{2+} liber din cioplasmă poate apare ca o consecinţă directă a activării unor receptori de către semnalele chimice extracelulare. Astfel de situaţii apar atunci cînd activarea receptorilor ar determina deschiderea unui canal de Ca^{2+} anexate. Deobicei însă astfel de creşteri apar ca o consecinţă a acţiunii unor mesageri secunzi interpuşi (DAG, 1—1,4,5 P_3 etc.), care permeabilizează membrana determinînd influxul din exterior, sau mobilizează ionul din depozite.

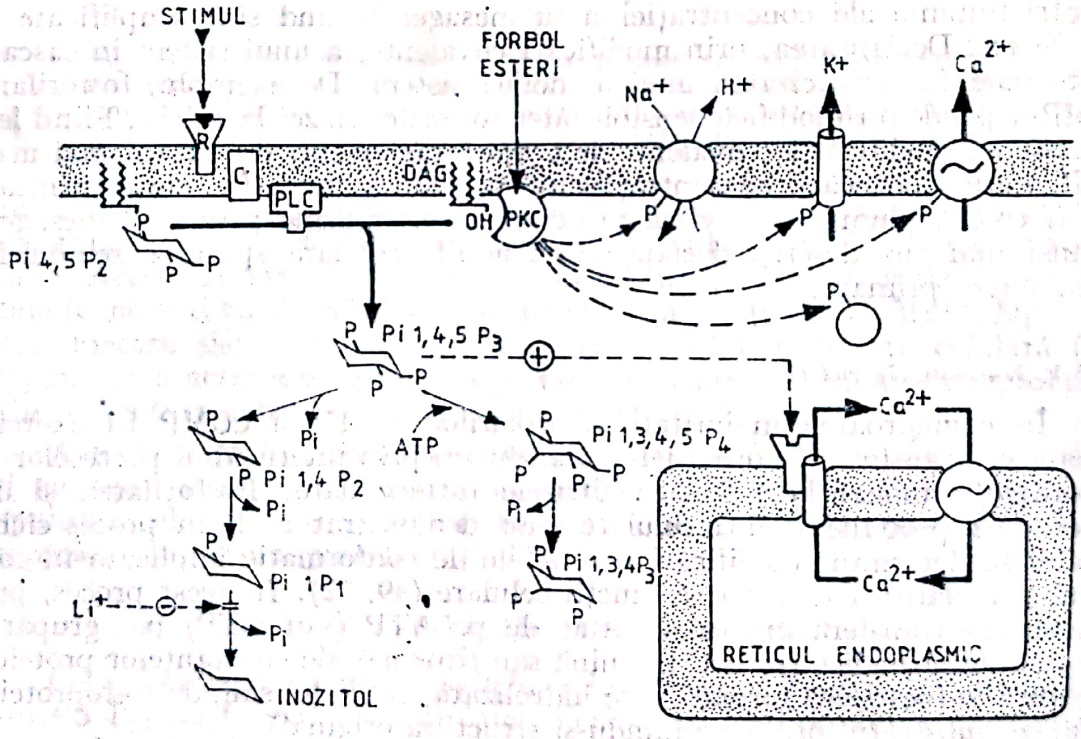


Fig. V. 20 — Mecanismele de acţiune şi metabolizare a IP 3.

Concentraţia calciului intracelular poate fi de asemenea crescută prin interferarea mecanismelor de extruzie către depozite sau către mediul extracelular. Complexitatea acestui echilibru este accentuată şi de faptul că, la rîndul lor, ionii de Ca^{2+} pot interveni în formarea altor mesageri secunzi (cGMP).

Scanned with OKEN Scanner

3.3.3. *Cuplarea mesagerilor secunzi cu răspunul celular*

Ca și în cazul mesagerilor primari, transferul informației conținute în mesagerii secunzi pe sistemele efectoare ale reacției celulare presupune de asemenea fixarea și recunoașterea mesagerului secund pe un receptor specific intracelular. Cuplarea mesagerului secund cu proteina receptoare declanșează de obicei o reacție secundară prin care se modifică starea funcțională a unei alte proteine (enzime), direct responsabile de răspunsul celular. După evoluția lor în timp se pot descrie două tipuri de reacții secundare:

— *reacții de ordinul milisecundelor* prin care modificarea conformațională a proteinei receptoare în momentul cuplării cu mesagerul secund determină direct efectul celular. Astfel, în cazul mușchiului, fixarea Ca^{2+} (mesager secund) pe troponina C (receptor intracelular) determină direct activarea ATP-azei actomiozinice și contracția;

— *reacții de ordinul secundelor-minutelor* în care, pentru realizarea răspunsului celular este necesară modificarea covalentă a uneia sau mai multor enzime (cascadă enzmatică). Este de exemplu cazul activării glicogenolizei în mușchi sub acțiunea cAMP sau Ca^{2+}. Dintre modificările covalente, cele mai frecvent întîlnite sînt fosforilările și defosforilările. Aceste modificări prezintă o serie de aspecte și avantaje. De exemplu, în astfel de reacții modificări minime ale concentrației unui mesager secund sînt amplificate de mii de ori. Declanșarea, prin modificări covalente, a unui sistem în cascadă poate modifica eficacitatea unui al doilea sistem. De exemplu, fosforilarea cAMP-dependentă modifică sensibilitatea fosforilchinazei la calciu. Fiind lent reversibile, modificările covalente determină răspunsuri de durată mai mare decît cea a modificării concentrației mesagerului secund. În cele ce urmează vor fi trecute sumar în revistă principalele mecanisme prin care mesagerii secunzi mai sus descriși declanșează reacțiile celulare specifice semnalelor hormonale primare.

3.3.3.1. *Nucleotidele ciclice*

În covîrșitoarea majoritate a cazurilor cAMP și cGMP își exercită funcția de transfer a informației extracelulare prin intermediul proceselor de fosforilare catalizate de proteinchinazele intracelulare. Fosforilarea și defosforilarea proteinelor intracelulare s-au demonstrat a fi un proces ciclic, capabil să determine modificări reversibile de conformație implicate în controlul și reglarea a numeroase funcții celulare (49, 72). În acest proces, proteinchinaza transferă gruparea fosfat de pe ATP (sau GTP) pe grupările hidroxil aminoacidice (serină, treonină sau tirozină) ale substanțelor proteice. Legătura fosfoesterică formată este hidrolizată, la rîndul său, de fosfoproteinfosfataze substratul proteic reluîndu-și structura originală.

Datele obținute pînă în prezent, deși departe de a fi exhaustive, au demonstrat totuși că numărul proteinchinazelor din diverse țesuturi și celule este relativ limitat. Proteinchinazele cAMP și cGMP dependente sînt formate dintr-o subunitate regulatoare, capabilă să se cupleze cu nucleotidul ciclic mesager și o subunitate enzimatică inactivă. Cuplarea cu mesajul secund determină activarea enzimei, însoțită sau nu de disocierea complexului, după cum este vorba de cAMP sau, respectiv, de cGMP.

Scanned with OKEN Scanner

Numărul redus al proteinchinazelor (de exemplu în țesutul nervos nu s-au descris mai mult de 3—4 activități proteinchinazice cAMP-dependente) ridică problema modului în care se realizează specificitatea de răspuns la semnalul intracelular. Date recente par să indice că această selectivitate se realizează prin prezența unor substraturi proteice specifice. În aceleași structuri nervoase în care s-au descris doar cîteva proteinchinaze cAMP-dependente,

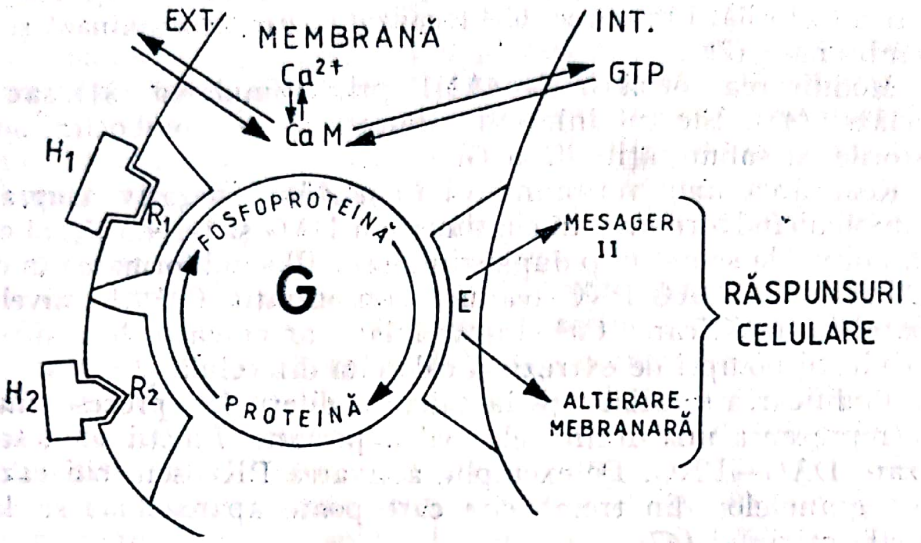


Fig. V. 21 — Activarea proteinei G din structura complexului receptor prin fosforilări declanșate de mesagerul secund care acționează antidromic prin calmodulina (CaM) intramembranară. Activarea receptorului R_1 poate determina prin acest mecanism creșterea sensibilității R_2 la hormonul specific.

cercetări ulterioare au evidențiat prezența a peste 20 de substraturi proteice membranare și peste 40 citoplasmatice, cu distribuție variabilă de la o zonă la alta. Aceste substraturi ar intra în joc în funcție de condițiile momentane locale (concentrația de ATP, durata reacției, prezența Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, pH etc.). Fiecare sistem fosforilant ar deservi o altă activitate celulară (30). Specificitatea acestui mod de reglare este determinată, după toate probabilitățile, de natura substratului fosfoproteic (31).

Activarea proteinchinazelor atît de către nucleotidele ciclice cît și de alți mesageri secundari, intervine nu numai anterograd în declanșarea unor răspunsuri celulare, dar și retrograd în modularea activității mecanismelor receptoare care le-au generat (fig. 21).

3.3.3.2. *Mesagerii secunzi derivați din fosfatidil inozitol*

Cei doi mesageri secunzi diacilglicerolul (DAG) și inositol-3,4,5 trifosfatul (i—1,4,5 P_3) au funcții intracelulare diferite. Diacilglicerolul, odată format, rămîne în planul membranei stimulînd proteinckinaza C (62). Cofactori esențiali pentru această acțiune sînt ionii de calciu și un alt fosfolipid-fosfatidil serina-, care se combină cu DAG și proteinchinaza C pentru a forma un complex cuaternar în interiorul membranei. În cursul formării acestui complex activ proteinchinaza C se deplasează din citosol și se leagă de membrană. Această translocare citosol-membrană a proteinchinazei C a fost observată în numeroase celule ca răspuns la o largă gamă de semnale externe (29, 32).

Scanned with OKEN Scanner

Proteinchinaza C poate fi activată de esterii de forbol cunoscuți agenți tumorigeni (19). Deși *in vitro* proteinchinaza C (PKC) poate fosforila numeroase proteine, nu s-a reușit pînă în prezent identificarea majorității substratelor proteice ale enzimei. Se consideră că funcția cheie a acestui sistem de semnalizare (DAG-PKC) ar putea fi aceea de modulare a altor căi de semnalizare. Din această categorie de acțiuni ar face parte:

a. Scăderea afinității receptorilor pentru factorul de creștere epidermică, ca urmare a fosforilării treoninei-654 localizată între tirozinkinază și domeniile transmembranare (26).

b. Modificarea formării de cAMP prin stimularea (81) sau inhibiția adenilciclazei (45). Efectul inhibitor, descoperit în trombocite, s-ar realiza prin fosforilarea subunității alfa a Gi.

c. Realizarea unui retroinhibiții în *feed-back* negativ asupra scindării I-4,5 P_2 împiedicînd formarea în continuare a DAG și 1-1,4,5 P_3, al căror nivel revine la normal la scurt timp după stimulare. Blocînd formarea în continuare a i-1,4,5, P_3 calea DAG-PKC readuce concentrația Ca^{2+} la nivel normal. Participarea la modificarea Ca^{2+} intracelular s-ar putea realiza și prin modularea activității pompei de extruzie a calciului din celulă (28, 71).

d. Modificarea sensibilității la calciu a diferitelor procese intracelulare ar putea reprezenta una dintre cele mai importante funcții ale sistemului de semnalizare DAG—PKC. De exemplu, activarea PKC sensibilizează puternic eliberarea granulelor din trombocite care poate apare chiar și la niveluri normale ale calciului (47).

Singurul inozitol fosfat căruia i s-a putut identifica un rol de mesager secund este I—1,4,5 P_3 și derivatul său ciclizat. Cuplîndu-se la nivelul unui receptor specific din membrana reticulului endoplasmic, inozitol — 1,4,5 trifosfatul determină un eflux pasiv de Ca^{2+}, probabil, prin activarea unui canal specific. În interval de secunde se poate realiza o eliberare a peste 50% din calciul stocat și o creștere abruptă a calciului liber din citoplasmă. Efectul este specific, nu apare în cazul altor organite și nu este afectat de temperatură sau de inhibitori ai pompei de Ca^{2+} (15).

Se presupune că I—1,4,5 P_3 ar interveni și în condiții de repaus, controlînd rata de reciclare a calciului (67). Activarea receptorului este condiționată de prezența grupărilor fosfat în pozițiile 4 și 5, în timp ce gruparea din poziția 1 mărește doar afinitatea moleculei pentru receptor (43). Acest receptor specific a fost pus în evidență cu (^{32}P) I — 1,4,5 P_3 (79). Recent s-a descris un derivat arilazidic capabil să blocheze ireversibil receptorii și eliberarea de calciu indusă de I—1,4,5 P_3 în macrofage (38).

Frecvent, ambii mesageri secunzi derivați, din PI acționează în comun declanșînd și modulînd procese celulare specifice de o mare complexitate și importanță. Astfel, factorii de creștere implicați în proliferarea fibroblaștilor (factorul plachetar, vasopresina, bombesina, prostaglandina $F_{2\alpha}$) stimulează degradarea PI, mobilizînd Ca^{2+} din depozite prin I—1,4,5 P_3 și determinînd creșterea alimentării de H^+ prin DAG—PKC care activează antiporter-ul Na^+—H^+. Astfel apar condițiile necesare stimulării sintezei de ADH (35). În afara participării la controlul creșterii celulare, cei doi mesageri secunzi participă integrat și la controlul secreției celulare. Numeroase substanțe capabile să declanșeze secreția prin exocitoză în diverse sisteme celulare acționează declanșînd degradarea PI, urmată de creșterea concentrației calciului citoplasmatic (55, 8). S-a descris participarea sistemului PI—I—1,4,5 P_3 la

Scanned with OKEN Scanner

cuplarea farmacomecanică prin care substanțe aplicate pe mușchiul neted determină contracția acestuia (2). Nu este exclusă nici participarea la cuplarea excitație-contracție din mușchiul striat, în care I—1,4,5 P_3 ar putea funcționa ca un mesager eliberat de tubii în T în momentul depolarizării (83, 84).

3.3.3.3. *Calciul liber din citoplasmă*

Datele acumulate pînă în prezent permit să se atribuie calciului citoplasmatic un rol central în declanșarea unui mare număr de răspunsuri celulare la semnale din mediul extern. Variațiile concentrației calciului liber din citoplasmă pot fi consecința directă a activării receptorilor specifici pentru anumite semnale chimice din mediul extern dar, foarte frecvent, reprezintă principala expresie celulară a angrenării altor sisteme de mesageri secunzi, după cum s-a menționat anterior. Acțiunile celulare multiple ale calciului sînt consecința cuplării sale cu numeroși receptori intracelulari (parvalbumina, calsechestrina, troponina C, calmodulina etc.). Activarea acestor receptori determină, la rîndul său, intrarea în acțiune sau modularea a numeroase sisteme biochimice a căror varietate abia începe a fi întrevăzută. Participarea troponinei C la mecanismul contractil din mușchiul scheletic sau cardiac, rolul calmodulinei în contracția mușchiului neted, activarea a numeroase proteinchinaze și a altor sisteme enzimatice etc. sînt doar exemplificări sumare ale unor aspecte mai bine cunoscute. Spațiul disponibil și scopul celor de față nu permit nici măcar o detaliere superficială.

3.4. Evaluarea cantitativă a receptorilor (Date sumare)

Locul central ocupat de receptori în declanșarea activităților celulare normale precum și implicațiile patologice care abia încep a fi examinate, justifică pe deplin necesitatea unei abordări cantitative a prezenței și distribuției acestor entități membranare în organism. Această abordare a devenit posibilă odată cu obținerea unor liganzi specifici (agoniști) marcați radioactiv. În cele de față nu vor fi abordate tehnicile autohistodiografice.

3.4.1. *Tehnici de legare a agoniștilor de receptori (fig. 22).*

În majoritatea țesuturilor concentrația receptorilor este de ordinul a 10^{-12}—10^{-9}M. Doar în cazul receptorilor nicotinici din organul electric de Torpedo s-au descris concentrații de ordinul a 10^{-6}—10^{-4}M. Datorită concentrațiilor reduse tehnicile de dozare a fixării radioliganzilor impun utilizarea unor substanțe care să aibă următoarele trei proprietăți (51):

a. Afinitate suficient de mare astfel încît constanta de disociere a complexului ligand-receptor să fie de ordinul concentrației receptorului.

b. Selectivitate atît de mare încît ligandul să se fixeze pe un singur tip de receptor, iar legarea nespecifică pe alte componente membranare să fie minimă.

c. Radioactivitate specifică suficient de mare pentru a permite dozarea la concentrații de femtomoli.

Cum majoritatea receptorilor sînt fixați pe membrane, liganzii trebuie să fie cît mai puțin hidrofobi pentru a se evita fixarea lor nespecifică pe lipidele membranare. Deși în majoritatea cazurilor hormonii și neuromediatorii

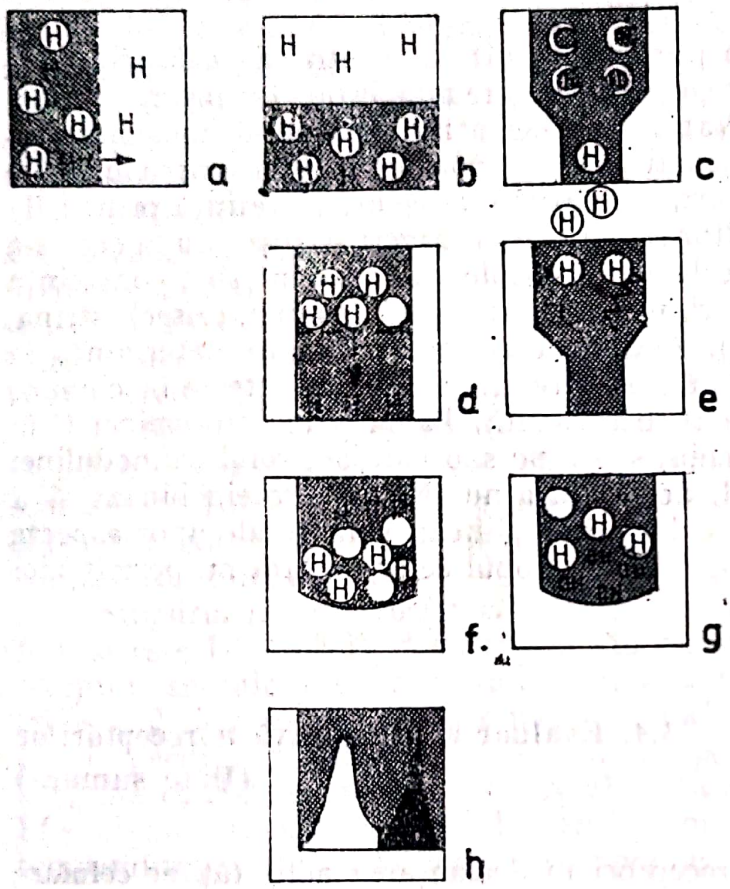


Fig. V. 22 — Tehnici de măsurare a legării macro-moleculelor solubile: a. Dializă la echilibru; b. Metoda fazelor la echilibru: c. Gel filtrare; d. Ultrafiltrare; e. Absorbția proteinelor; f. Precipitare sau centrifugare; g. Absorbția ligandului; h. Migrare diferențială.

naturali sînt substanțe hidrofile, afinitatea lor față de receptorii specifici nu este suficient de mare pentru a asigura o constantă de disociere la nivelul concentrațiilor reduse de receptori ce se obțin *in vitro*. De exemplu, noradrenalina și adrenalina realizează o constantă de disociere de receptorul beta adrenergic de ordinul micromolilor, în timp ce concentrația maximă de receptor realizabilă *in vitro* este de ordinul nanomililor. Din acest motiv se utilizează un ligand farmacologic de mare afinitate-propranolul. Acest ligand fiind însă și hidrofob, se leagă în oarecare măsură de membrană în mod nespecific. În aceste condiții, dozările de beta-receptori specifici necesită și stabilirea prealabilă a acestei legări nespecifice.

Izotopul ^{125}I care, realizînd o radioactivitate specifică înaltă (2200 Ci/mmol), permite marcarea liganzilor la niveluri suficiente pentru o dozare precisă, este de preferat ori de cîte ori poate fi utilizat fără a altera ligandul. Tritiul (^{3}H), ^{14}C, ^{32}P au în general activități mai reduse și nu pot fi utilizați pentru dozarea receptorlor în concentrații de ordinul femto-sau picomolilor.

În principiu, tehnicile uzuale de dozare a receptorilor cu liganzi specifici constau în punerea în contact a preparatului celular conținînd receptorii cu

ligandul specific. Cum receptorii sînt inclavați în membrane, complexele ligand-receptor formate pot fi separate cu ușurință de ligandul solubil prin filtrare sau centrifugare. Evident, rata de disociere a complexului trebuie să fie lentă comparativ cu rata de separare, ceea ce permite să se determine exact activitatea inclusă în complexe și cea a ligandului liber. (Tabel I).

TABEL II

Principalele tehnici de dozare a receptorilor cu liganzi marcați

Tehnica	Mărimea determinată	Avantaje	Dezavantaje
Filtrare	RL, L_{liber}	Rapidă, duplicate numeroase	Nu poate fi utilizată cînd t 1/2 a complexului RL este sub 15 sec.
Ultracentrifugare	RL, L_{liber}	Poate fi utilizată cînd t 1/2 a complexului RL este redus sau nu poate fi utilizată ultracentrifugarea	Lentă, duplicate puține, uneori legare nespecifică importantă.
Dializă la echilibru	RL + L_{liber}	Condiții de echilibru real	Lentă, complicată
Dializă în flux	L_{liber}	Rapidă, numeroase puncte din aceeași probă	Uneori fixare nespecifică importantă
Gelfiltrare pe coloană	L_{total} RL	Adecvată pentru receptori solubili	Lentă
Precipitare cu polietilenglicol	RL, L_{liber}	Adecvată pentru receptori solubili Dozare prin centrifugare sau filtrare	Mult mai rapidă decît filtrarea pe gel
Filtrare prin filtru cu polietilenimidă	R, L_{liber}	Adecvată pentru receptori solubili	Rapidă, reproductibilă, superioară metodei cu polietilenglicol

RL: complex, receptor-ligand; L_{liber}: ligand liber; L_{total}: ligand total.

3.4.1.1. *Filtrarea*

După echilibrarea preparatului biologic cu ligandul radioactiv sau rășini, amestecul este filtrat prin diverse tipuri de filtre sau coloane cu gel sau rășini. Pentru a reduce constanta de disociere a complexului se utilizează pentru spălare soluții tampon la temperaturi scăzute. Metoda nu poate fi utilizată la constante de disociere care depășesc 5 nM (timp de înjumătățire a complexului: 0,28—1,4 sec.) (fig. 23).

Scanned with OKEN Scanner

3.4.1.2. *Centrifugarea*

În acest caz amestecul receptor-ligand este separat prin centrifugare și sedimentul va conține complexul receptor-ligand aflat în echilibru cu ligandul liber din lichidul inclus în sediment. Volumul acestui lichid poate fi aflat utilizînd compuși inerți marcați radioactiv (inulină, sucroză etc.) lipsiți de afinitate pentru membrane.

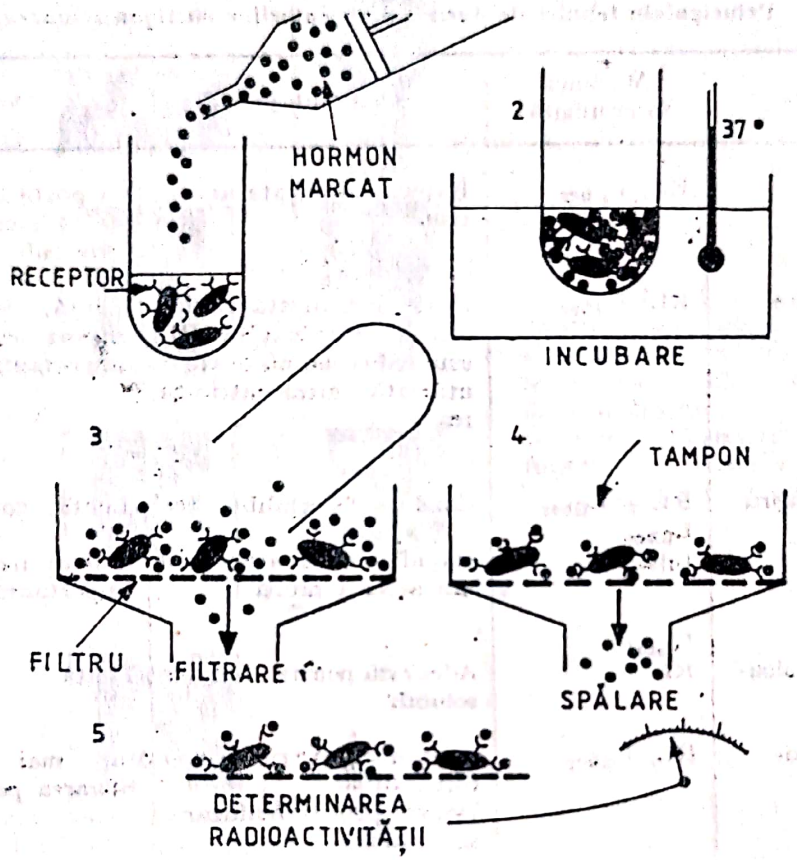


Fig. V. 23 — Principiul tehnicii de filtrare.

3.4.1.3. *Dializa la echilibru și în flux*

Separarea complexelor ligand-receptor de ligandul rămas liber se poate realiza prin dializă staționară, utilizînd membrane de dializă adecvate, Metoda presupune însă durate mari care ridică probleme legate de inactivarea receptorilor, evaporare cu modificări de concentrație sau chiar de fixare pe membrana de dializă. O îmbunătățire certă a tehnicii esre cea obținută cu celule de dializă în flux (tehnica Colowick-Womack).

3.4.1.4. *Dozarea receptorilor solubilizați*

Frecvent, mai ales în cursul cercetărilor de izolare și purificare a receptorilor, este necesară dozarea receptorilor solubilizați și extrași din membrane. În astfel de dozări se utilizează tehnica coloanelor. Ligandul specific marcat este echilibrat cu receptorul solubilizat, iar amestecul este trecut printr-o sită moleculară (coloană cu Sephadex G-25 sau G-50) care exclude receptorul

Scanned with OKEN Scanner

solubilizat și nelegat. Astfel de separări se realizează la rece pentru a evita disocierea complexului.

Alternativ, complexul ligand-receptor poate fi precipitat cu polietilenglicol în prezența unei proteine purtătoare (gammaglobulină). Precipitatul este separat prin centrifugare sau filtrare prin filtre cu fibre de sticlă. Tehnica a fost utilizată cu eficacitate în determinarea legării ^{125}I-insulinei de receptorii la insulină solubilizați. Este posibilă separarea complexului receptor solubilizat-ligand marcat și prin filtrare directă, utilizînd filtre din fibră de sticlă pretratate cu polietilenimină. Tehnica reduce semnificativ proporția de legare nespecifică. O altă tehnică, mai complexă, este și cea în cursul căreia receptorii solubilizați sînt reinserați în membrane fosfolipidice sintetice. Ulterior se măsoară capacitatea receptorului reconstituit de a lega ligandul radioactiv prin metoda filtrării: Această tehnică este indicată doar în situațiile în care detergentul trebuie îndepărtat întrucît împiedică radiodozarea legării de receptor.

3.4.1.5. *Legarea nespecifică*

Uzual, termenul desemnează fixarea ligandului pe componente nereceptoare din membrană (lipide și proteine) aflate în exces semnificativ față de receptori. Determinarea componentei nespecifice a curbei de legare se poate realiza măsurînd legarea radioligandului în prezența unor concentrații de 100 ori mai mari de ligand nemarcat. Metoda se bazează pe presupunerea că, în aceste condiții, receptorii sînt saturați, în timp ce o fracție importantă a situsurilor nespecifice rămîne neafectată. În aceste situații se recomandă utilizarea mai multor tipuri de liganzi.

În unele situații, tot mai frecvent întîlnite, același ligand se poate fixa pe mai multe tipuri de receptor. În astfel de situații explorarea se realizează incluzînd succesiv în amestecul de incubare concentrații saturante de ligand specific tipului de receptor care nu se dozează.

3.4.2. *Analiza datelor rezultate din tehnicile de legare*

Interpretarea datelor obținute din tehnicile sumar enumerate se realizează pe baza unor reprezentări grafice mai mult sau mai puțin complexe a căror utilizare este condiționată de scopul determinării și condițiile în care se desfășoară. În cele ce urmează se vor discuta sumar cîteva situații mai reprezentative.

3.4.2.1. *Legarea simplă necooperativă*

Majoritatea proceselor de legare a receptorilor sînt procese simple necooperative ce pot fi reprezentate prin cîteva metode grafice (fig. 24).

a). *Reprezentarea directă* — în care se reprezintă cantitatea de ligand fixat (pico-sau femtomoli/ng) versus concentrație ligandului liber (nM).

b. *Reprezentarea semilogaritmică* — în care ligandul liber se reprezintă logaritmic. Frecvent, în loc de ligandul legat se reprezintă ocuparea fracțională a receptorilor (Y), adică raportul dintre cantitatea de ligand fixat și

Scanned with OKEN Scanner

cantitatea maximă de ligand fixat. Această modalitate permite reprezentarea simultană a numeroase curbe ce diferă prin ordine de mărime. Distanța dintre curbe va fi proporțională cu diferențele de afinitate.

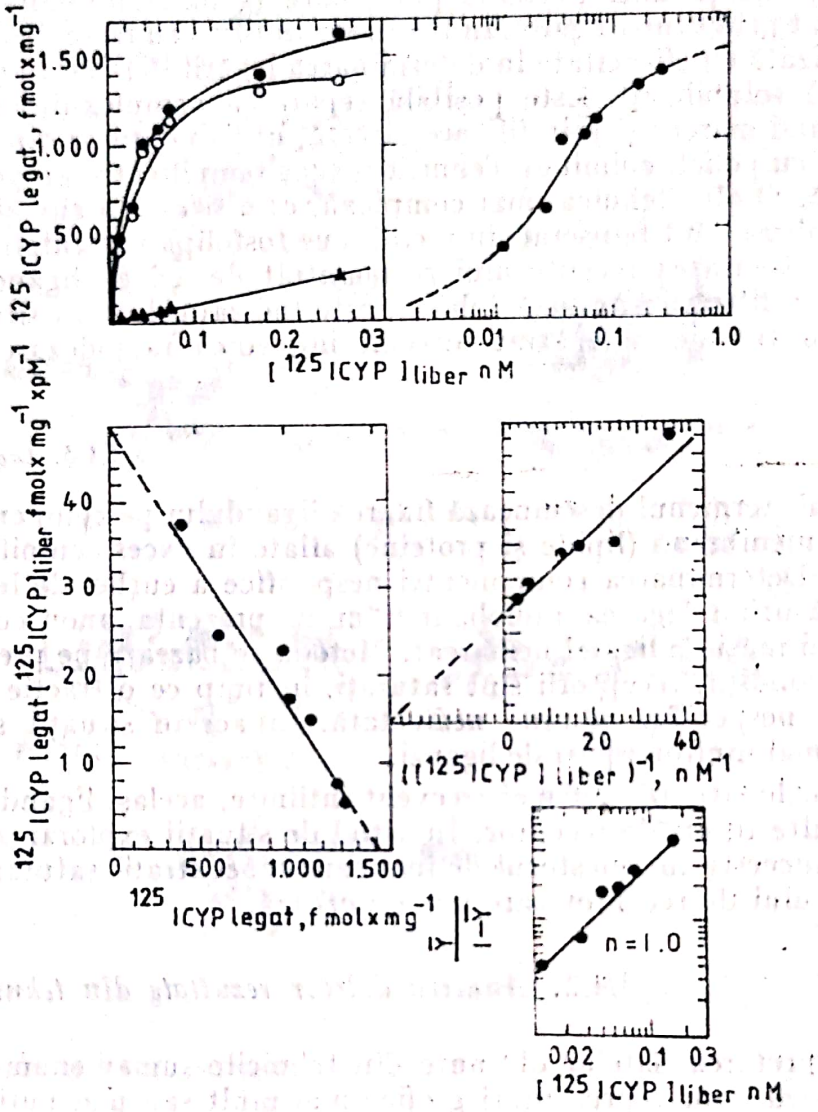


Fig. V. 24 — Modalități de reprezentare a legării 125 I-cianopindololului de membranele hematiei purificate. *Stînga sus*: reprezentare directă (triunghiuri: legare nespecifică: cercuri goale; legare specifică; cercuri pline: legare totală) *Stînga jos*: Reprezentarea Scatchard. *Dreapta sus*; Reprezentare semilogaritmică. *Dreapta centru*: Reprezentare dublu reciprocă. *Dreapta jos*: Reprezentare Hill.

c. *Reprezentarea Scatchard*

Se realizează pe baza relației:

$$\frac{N}{L_{liber}} = \frac{N_{max}}{Kd} - \frac{N}{Kd}$$

în care N este cantitatea de ligand fixată la fiecare valoare a ligandului liber (L_{liber}) iar N_{max} este cantitatea maximă de ligand fixat. Se reprezintă N/L_{liber}

versus N. Dacă înregistrarea este liniară, ligandul se leagă de o clasă de receptori independenți cu afinitate egală. Panta curbei măsoară direct afinitatea ligandului pentru receptor (panta $= -K_{asociere} = 1/K$ disociere-d). Astfel de reprezentări se utilizează și în cazuri mai complexe (legare pozitiv sau negativ cooperativă, legare pe situsuri multiple). În astfel de cazuri, curba Scatchard nu mai este liniară dar poate fi totuși interpretată.

d. *Reprezentarea dublu reciprocă*

Constă din reprezentarea valorilor reciproce a celor două mărimi. Intersecția cu abcisa dă valoarea reciprocă a legării maxime, iar cea cu ordonata reprezintă valoarea negativă reciprocă a constantei de disociere aparentă. Curba devine convexă cînd legarea este pozitiv cooperativă și concavă în situația opusă sau cînd este vorba de situsuri cu afinități variate.

e. *Reprezentarea Hill*

A fost utilizată pentru prima oară pentru a exprima legarea pozitiv cooperativă a O_2 de hemoglobină. Ecuația utilizată este, în forma derivată:

$$\log \frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}} = \log \frac{1}{K} + N_{max} \log L$$

în care Y este raportul dintre cantitatea de receptori liberi și cantitatea totală de receptori, iar $1-\bar{Y}$ raportul dintre cantitatea de receptori complet saturați și cantitatea totală de receptori. Reprezentarea valorii $\log \frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}$ versus logaritmul concentrației de ligand liber (log L) generează o linie dreaptă, a cărei pantă reflectă valoarea N_{max} (numărul moleculelor de ligand fixate pe un receptor) Deși modelul conține o serie de aproximații, utilizarea sa aduce totuși informații importante.

3.4.2.2. *Curbele de deplasare (competiție)*

În numeroase situații fixarea ligandului a cărui constantă de disociere dorim să o aflăm este prea laxă pentru a putea efectua experimente de legare directă. În astfel de situații se realizează experimente de competiție în care se înregistrează deplasarea ligandului marcat de un competitor neradioactiv. Se reprezintă raportul procentual ligand fixat/ligand total versus concentrația de ligand competitiv nemarcat (fig. 25). Într-o astfel de reprezentare concentrația de competitor necesară pentru a reduce legarea cu 50% ($H_{0,5}$) se corelează cu constanta sa de disociere (K_H).

[redacted] $K_H \approx H\,0,5$

Relația este valabilă doar la concentrații de radioligand mult reduse față de constanta de disociere a acestuia.

Frecvent, analiza competiției dintre o substanță competitivă farmacologic și ligandul primar se realizează cu ajutorul reprezentării Schild. Se reprezintă logaritmic „raportul de doză" (D.R—1) versus concentrația de competitor. Prin D.R. se înțelege raportul dintre dozele de ligand primar care în absența sau în prezența competitorului farmacologic dau aceeași ocupare a receptorilor (în experimente cu radioliganzi) sau același răspuns biologic (cînd acesta este măsurat).

3.4.2.3. *Fixarea nonmichaeliană a liganzilor pe receptori*

În situații a căror analiză detaliată nu-și are locul în cele de față, tehnicile și metodele de interpretare mai sus enumerate generează curbe atipice

Scanned with OKEN Scanner

a căror interpretare este dificilă și necesită o abordare tehnică și matematică mult lărgită. Succint, astfel de situații pot apare în fenomenele de cooperativitate negativă sau pozitivă, precum și în cazul populațiilor eterogene de receptori sau situsuri receptoare.

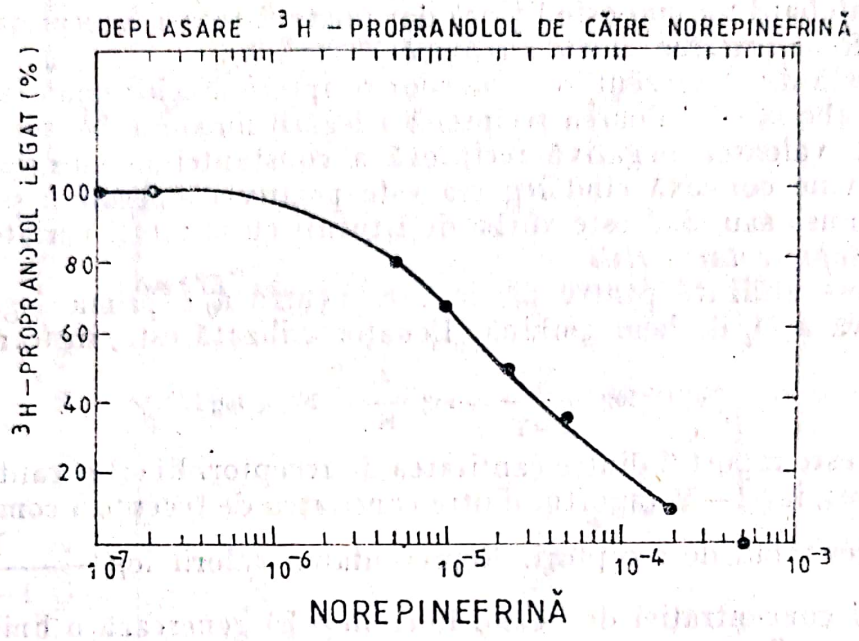


Fig. V. 25 — Curbă de deplasare.

3.5. Date ilustrative privind unii receptori membranari

3.5.1. *Receptorul insulinic.*

Diversitatea acțiunilor hormonale exercitate de insulină, intervenția hormonului în declanșarea și modularea activității celulare în majoritatea țesuturilor din organism justifică pe deplin eforturile depuse pentru elucidarea mecanismelor sale de acțiune și în mod deosebit a intervenției receptorilor specifici.

3.5.1.1. *Aspecte structurale*

Acțiunile insulinei se explică prin existența receptorilor specifici membranari. Aceste structuri se caracterizează printr-o afinitate mare pentru hormon (Ka = 1 nM) și o densitate redusă. Chiar și în celulele cele mai bogate în receptori insulinici proteina receptoare nu reprezintă decît 0,01% din totalul proteinelor membranare (24). Cu toată această paucitate relativă, se pare că numărul existent de receptori depășește cu mult nevoile celulare pentru realizarea unui răspuns fiziologic maxim. Activarea doar a 5% din receptori insulinici de pe adipocite determină, de exemplu, atingerea valorilor maxime ale transportului de glucoză. Este posibil prin urmare ca celulele să posede o

Scanned with OKEN Scanner

rezervă importantă de receptori insulinici. Pe de altă parte, excesul de insulină circulantă (obezitate) poate determina o desensibilizare a țesuturilor țintă realizată, probabil, prin endocitoza crescută a complexelor receptor-hormon. Existența unei reciclări imediate a acestor complexe nu a fost încă demonstrată

Structura chimică a receptorului insulinic a început a fi descifrată după obținerea unor cantități suficiente de proteină receptoare cît mai purificată cu ajutorul unor leganzi specifici sau anticorpi. Datele obținute au demonstrat că receptorul insulinic este format din minimum 4 subunități legate prin punți disulfidice într-un mare complex cu p.m. 350.000. Două subunități (alfa) sînt legate între ele prin punți disulfidice, în timp ce subunitățile beta se leagă de primele. De subunitățile descrise se atașează lanțuri oligozaharidice conținînd acid sialic. Ambele subunități sînt expuse pe fața externă a membranei. Din subunitățile beta a putut fi separată proteolitic o altă subunitate — beta 1. Este posibil să existe și alte subunități proteice neidentificate pînă în prezent. Nu s-a reușit pînă în prezent să se determine precis implicațiile funcționale ale acestei structuri subunitare a receptorului.

3.5.1.2. *Mecanismele de acțiune declanșate de formarea complexului hormonreceptor insulinic*

Nici pînă în prezent nu este clarificată natura mesagerului secund care ar media eventual acțiunile multiple declanșate de cuplarea insulinei cu receptorul specific. Încercările de a atribui acest rol cAMP, cGMP sau ionilor de Ca au fost pînă în prezent lipsite de succes. Un exemplu edificator în acest sens este cel al activării glicogen-sintetazei de către insulină. Această acțiune este determinată de hormon prin defosforilarea enzimei. Defosforilarea insulin-mediată este determinată atît prin inhibiția unei proteinchinaze cAMP-dependente, cît și prin activarea unei proteinfosfataze. Dealtfel și în cazul altor proteine insulina determină efecte similare fără a putea fi implicat vreun sistem mesager secund cunoscut (86). În ultimii ani s-au realizat progrese mai ales în ceea ce privesc trei direcții mai importante. S-a demonstrat că după formarea sa, complexul insulină-receptor este internalizat și degradat la nivelul lizozomilor, rezultînd produși de degradare care ar putea eventual explica unele acțiuni ale insulinei. Acești produși activi ar putea rezulta fie din clivarea insulinei fie eventual din fragmentele de membrană antrenate în acest proces care ar putea de exemplu participa la creșterea insulin-dependentă a transportului transmembranar de glucoză. Un alt aspect recent descris este cel al activării insulin-dependente a fosforilării proteinelor membranare, realizată probabil printr-o proteinchinază GTP-dependentă. Aceste fosforilări ar putea eventual explica creșterea transportului transmembranar de glucoză. Încercările de a descoperi mesagerul secund necunoscut al insulinei au dus la izolarea unui factor peptidic capabil să exercite cel puțin unele dintre acțiunile insulinice.

3.5.2. *Receptorii opiacei*

Ideea că analgezicele narcotice opiacee trebuie să se lege de situsuri specifice din sistemul nervos central datează din anii 1940, fiind determinată de efortul de a sintetiza analogi de morfină și de descoperirea restricțiilor struc-

Scanned with OKEN Scanner

turale și sterice care condiționau acțiunea noilor compuși. Dar abia în 1973 s-a reușit să se demonstreze biochimic legarea specifică opiațiilor în diverse țesuturi. Larga răspîndire a receptorilor pentru opiacei, la rîndul său, a dus la încercările, de a evidenția un eventual ligand endogen, încununate de succes în 1975 (40). Din această categorie sînt cunoscute astăzi encefalinele, endorfinele și dinorfina recent descoperită (34).

3.5.2.1. *Receptorii opiacei multipli*

Varietatea efectelor farmacologice exercitate de opiați făcea improbabilă existența unui singur tip de receptor. Probabilitatea existenței unor clase multiple de receptori la opiați a fost evidențiată pentru prima oară în 1976 (56). Pe baza acestor cercetări s-a ajuns la concluzia că ar exista cel puțin 3 categorii de receptori numiți *miu*, *kappa* și *sigma* după inițiala ligandului specific (morfină, ketociclazocină și respectiv SKF — 10.047). Ulterior, receptorii de tip *miu* au fost diferențiați de receptorii tip *delta* cu afinitate pentru encefaline. Cele patru categorii astfel descrise sînt astăzi clar definite pe baza afinității pentru liganzi și antagoniști, iar rolul lor specific este demonstrat de diferențele de repartizare în zone cu funcții specifice. De exemplu, receptorii de tip miu predomină în talamus și substanța neagră, în timp ce receptorii de tip delta predomină în cortexul frontal și hipocamp. Date similare privind localizarea diferențială s-au obținut și în cadrul receptorilor kappa-dinorfin specifici și sigma (48).

În afara celor 4 tipuri de receptori opiacei complet descriși, pe baza cercetărilor cu liganzi marcați și a unor diferențe în ordinea de afinitate s-a sugerat existența altor subtipuri de receptori opiacei: *miu*-1, specific pentru analgezie (65); *epsilon*, endorfin specific din canalul deferent (50, 86); *tau*, prezent în ileonul de cîine și iepure (63).

Utilizîndu-se o mare diversitate de detergenți, în ultimii ani s-a reușit solubilizarea receptorilor opiacei obținîndu-se concentrate de proteină activă care a putut fi purificată pînă la de 50 ori și s-a dovedit a fi o glicoproteină.

3.5.2.2. *Evenimente biofizice și biochimice declanșate de fixarea agoniștilor pe receptorii opiacei*

Studii realizate pe omogenate și secțiuni cerebrale au demonstrat că după cuplarea cu ligandul receptorul opiaceu suferă o transformare sodiu-dependentă, eventual responsabilă de modificări membranare cu alterări de flux ionic ce ar putea determina hiperpolarizare.

Cercetările efectuate au evidențiat modificări variabile ale producerii de cAMP în condițiile activării receptorilor opiacei. Efectele par a fi calciu-dependente și se manifestă atît în cazul adenilaciclazei PGE-activate cît și în cazul celei dopamin-stimulate.

Pe culturi celulare (neuroblastoame), expunerea cronică la opiații determină creșterea treptată a activității adenilatciclazei. Administrarea de naloxon pe astfel de celule preatratate cronic determină activări bruște ale adenilatciclazei cu acumulări deosebit de mari de cAMP (x5), care se reduc după 24 ore și par a reprezenta echivalentul fenomenului de suprimare în toleranța și dependența morfinică. Efectul activării receptorilor de către liganzii endo-

Scanned with OKEN Scanner

geni s-a demonstrat a fi realizat prin intermediul unei subunități traducătoare de tip Gi.

În cazul receptorilor opiacei s-au descris de asemenea fenomene receptoare realizate prin creșteri și scăderi ale numărului de receptori (*up-* și *down-regulation*). Creșterea expunerii la liganzi reduce capacitatea celulelor de a lega opiați, în timp ce tratamentul de durată cu naloxon (blocant specific) crește capacitatea de legare a agoniștilor.

3.6. Unele implicații fiziopatologice ale mecanismelor de comunicare intercelulară prin receptori

Ținînd cont de semnificația funcțională a mecanismelor prin care hormonii își exercită acțiunile la nivel celular, se putea anticipa cu ușurință intervenția acestor mecanisme în domeniul fiziopatologiei. Într-adevăr, în ultimii ani s-au acumulat dovezi considerabile privind existența unor astfel de implicații. Continuînd analogia semnalată de Ariens (5) între sistemele receptoare și cele enzimatice, așa cum se vorbește despre o enzimopatologie se poate vorbi și despre o receptoropatologie în plină expansiune.

Într-o încercare de clasificare preliminară, patologia comunicării chimice intercelulare poate fi divizată în:

— tulburări ținînd de geneza, structura chimică și moleculară implicit activitatea semnalului chimic hormonal;

— tulburări ținînd de prezența, densitatea, configurația moleculară și capacitatea structurilor receptoare legate sau nu de alte modificări ale structurilor membranare;

— tulburări ținînd de prezența și capacitatea funcțională a mecanismelor traducătoare care inițiază cascada evenimentelor biochimice intracelulare (formarea mesagerilor secunzi, modificări ale configurației canalelor transmembranare etc.);

— tulburări ținînd de capacitatea funcțională a mecanismelor intracelulare activabile de către mesagerii secunzi (prezența și capacitatea funcțională a sistemelor enzimatice efectoare, prezența substraturilor specifice etc.).

Este evident că, avînd în vedere acumularea rapidă a datelor în ultimii ani, cele de față nu pot reprezenta decît o abordare sumară cu titlu cel mult exemplificativ. Tratarea exhaustivă a problemei ar avea dimensiuni depășind chiar nivelul unei simple monografii. În acest domeniu se profilează probabil necesitatea apariției primului tratat de receptoropatologie.

Cum conceptul de receptori hormonali specifici a fost primul explorat, majoritatea cunoștințelor obținute pînă în prezent se referă la prima treaptă a cascadei de evenimente celulare ce inițiază acțiunile hormonale. Abia au început să se acumuleze date cu privire la anomalii prezente în etapele următoare (de ex. : activirea deficitară a adenilatciclazei în pseudohipoparatiroidism). Cel puțin deocamdată, receptoropatologia este larg evaluată doar în domeniul endocrinologiei și doar incidental în alte domenii. Este posibil ca în viitorul apropiat alte domenii (neurologia, patologia cardiovasculară, renală etc.) să fie tot mai larg interesate în astfel de aspecte.

Scanned with OKEN Scanner

3.6.1. *Implicații patologice ale receptorului pentru TSH*

Datele obținute pînă în prezent au permis clasificarea defectelor receptorilor pentru TSH în defecte intrinseci (primare) și extrinseci (secundare) (25) (tabelul III).

TABEL III

Clasificarea bolilor receptorului la TSH

Boli primare
Receptorii congenital anormali
Guşa multinodulară
Neoplazia tiroidiană
Boli secundare
Boala Graves
Tiroidita autoimună
Tiroidita subacută
Coricarcinom şi mola hidatiformă
Adenom hipofizar TSH-secretor

3.6.1.1. *Bolile primare ale receptorilor la TSH*

Se caracterizează prin alterări ale receptorilor capabile să genereze cantități clinice destul de bine cunoscute. S-au descris două forme de disfuncție congenitală a receptorilor la TSH. Prima formă, destul de rară, se caracterizează printr-un defect tiroidian izolat și evoluează clinic ca o hipotireoză congenitală. În a doua formă defectul este generalizat și se caracterizează clinic prin așa zisul pseudohipoparatiroidism în care s-a implicat recent și un defect al proteinei reglatoare G cu activare insuficientă a adenilatciclazei. Alte modificări primare sînt cele observate în forme de gușă multinodulară caracterizate prin supersensibilitate tiroidiană la TSH, explicată prin existența și dezvoltarea unei clone celulare caracterizată printr-o astfel de tulburare. În fine, unele forme de neoplazie tiroidiană se pot caracteriza printr-o aplazie a receptorilor TSH-specifici.

3.6.1.2. *Boli secundare ale receptorilor TSH-specifici*

Sînt legate de prezența anticorpilor anti-receptor TSH (TSAb), care stimulînd celulele tiroidiene, pot determina boala Graves. În aceste situații, receptorii tiroidieni TSH-specifici sînt normali. Manifestări autoimune similare, dar cu anticorpi blocanți sînt prezente în restul bolilor secundare menționate în tabelul de mai sus.

3.6.2. *Implicații patologice ale receptorilor insulinici*

Rezistența la insulină este de asemenea expresia unei anomalii a receptorilor specifici din țesuturile — țintă explicată, în funcție de forma clinică în care apare, de un fenomen de *"down-regulation"* a receptorilor specifici,

Scanned with OKEN Scanner

de o disfuncție congenitală, sau în fine de prezența în circulație a autoanticorpilor specifici. Tot sumar se poate semnala și existența unei hipersensibilități la insulină asociată unei supersensibilități explicate prin creșterea densității sau afinității receptorilor.

La datele succint și parțial prezentate în cele de mai sus poate fi adăugat, tot cu titlu exemplificativ, exemplul miasteniei gravis mai larg prezentată în alt capitol. (a se vedea cap. VIII).

Bibliografie selectivă

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. — Biologie moléculaire de la cellule, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986, 673—765.
2. ALEXANDER R.M., BROCK T., GIMBRONA M., ROTTENHOUSE S. — Hypertension, 1985, 7, 477.
3. AHLQUIST R. — Amer. J. Physiol., 1948, 153, 586.
4. ARIENS E. J. — în Molecular Pharmacology, (sub red. Ariens E. J.), Academic Press N. Y. 2964, 1, 119.
5. ARIENS E. J., — Pharm. Weekb, 1983, 4, 121.
6. ARIENS E. J., BELD A. J., MIRONDA J., SIMONIS A. — în The Receptors, (sub red. O'Brien R. D.), Plenum Press N. Y., 1979, 1, 33.
7. BATTY I., NAHORSKI S., IRVINE R. — Biochem. J., 1985, 232, 211.
8. BAKER P., KHIGHT D. — Brit. Med. Bul., 1986, 42, 399.
9. BELD A., ARIENS E. J. — Eur. J. Pharmacol., 1974, 25, 203.
10. BENGA GH. — Biologie celulară și moleculară, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1985, 94—95.
11. BERRIDGE M. — Curr. Rev. Biomed., (sub red. Lamble J. W.), Elsevier/North Holland 1981, 1, 122.
12. BERRIDGE M. — Moll. Cell. Endocrinol., 1981, 24, 115.
13. BERRIDGE M. — Biochem. J., 1984, 220, 345.
14. BERRIDGE M., IRVINE R. F. — Nature, 1984, 312, 315.
15. BERRIDGE M. — Biol Chem. Hoppe Seyler, 1986, 367, 447.
16. BOLHUIS R. L. H., GRAVEKAMP C., VAN DE GRIEND R. — Clin. Immunol. Allergy, 1986, 6, 29.
17. BORGARD J. P., LALÈGERIE P. — Ann. Biol. Clin., 1980, 38, 3.
18. CARPENTER G., COHEN S. — Ann. Rev. Biochem., 1978, 48, 193.
19. CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUCHI K., NISHIZUKA Y. — J. Biol. Chem. 1982, 257, 7847.
20. CATT K. J., HARWOOD I., AGUILERA G., DUFAN M. — Nature, 1979, 280, 109.
21. CHABRE M. — în „Hormone and Cell Regulation", (sub red. Bockaert J.), Elsevier Biochemical, 1984, 3, 87.
22. CLINE M., GOLDE D. W. — Nature, 1979, 277, 171.
23. COCKROFT S., GOMPERTS B. D. — Nature, 1985, 314, 534.
24. CZECH M. O., MASSAGUE J., PILCH P. — în More About Receptors-Curr. Rev. Biomedicine, (sub red. Lamble J. W.), Elsevier Biomed. Press. Amsterdam, 1982, 2, 254.
25. DAVIES T. F. — Clin. Endocrinol. Meted., 1983, 12, 79.
26. DAVIS R. J., CZECH M. P. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 4080.
27. DEBRAY H. — Bull Cancer, 1979, 66, 353.
28. DRUMMOND A. M. — Nature, 1985, 315, 752.
29. DRUST D., MARTIN J. — Bichem. Biophys. Res. Commun. 1985, 128, 531.
30. EHRLICH Y. H. — în Handbook of Neurochemistry, (sub red. A. Lajtha), Plenum Press N. Y. Lond., 1984, 6, 541.
31. EHRLICH Y. H. — Adv. Exp. Med. Biol., 1979, 116, 75.
32. FARRAR W. L., ANDERSON W. B. — Nature, 1985, 315, 233.
33. GILMAN A. G. — J. Clin. Invest., 1984, 73, 1.
34. GOLDSTEIN A., FISCHLI W., LOWNEY L., HOOD L. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 7219.

Scanned with OKEN Scanner

35. HASEGAWA., SASAKI H. — Biochem. J., 1985, 232, 99.
36. HASLAM R., DAVIDSON M. — FEBS Lett., 1984, 174, 90.
37. HESLIP J., IRVINE R., TASHJIAN A., BERRIDGE M. — J. Expl. Biol., 1985, 119, 395.
38. HIRATA M., SASAGURI T., UASNACHI T., HASHOMOTO T., KOGA T. — Nature, 1985, 317, 723.
39. HOKIN M., HOKIN L. — J. Biol. Chem. 1953, 203, 967.
40. HUGHES J. — Brain Res., 1975, 88, 295.
41. HYNES R. O. — Pour la Science, 1986, 106, 18.
42. IRVINE R. F., ANGGARD E., LETCHER A., DOWNES C. P. — Biochem. J., 1985, 229, 237.
43. IRVINE R. F., BROWN K. D., BERRIDGE M. — Biochem. J., 1984, 221, 269.
44. IRVINE R. F., LETCHER A., HESLOP J., BERRIDGE M. — Nature, 1986, 320, 631.
45. JACOBS K., BOUER S., WATANATE Y. — Eur. J. Biochem., 1985, 151, 425.
46. KING A., CUNTRECASAS P. — N. Engl. J. Med., 1981, 305, 77.
47. KNIGHT D. E., SCURTTON M. — Nature, 1984, 309, 66.
48. KOSTERLITZ H., PATERSON S., ROBSON L. — Birt. J. Pharmacol., 1981, 73, 931.
49. KREBS E. G., BEAVO J. A. — Ann. Rev. Biochem., 1979, 48, 923.
50. LEMAIRE S., MAGNON J., REGNOLI D. — Brit. J. Pharmacol., 1978, 64, 327.
51. LEVITZKI A. — Receptors a Quantitative Approach. The Benjamin/Cummings Pbl. Co. Menlo Park, California, 1984.
52. LISSITZKY J. C., KOPP F., CHARPIN C., CHIAROTTI Y., BIGNON CH., MARTID P. M. — Sem. Hop. Paris, 1986, 62, 3659.
53. LOEWENSTEIN W. R. — în Physiology of Membrane Discorders, Ed. a II-a, (sub red. T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz) Plenum Medical Book Company, New York and London, 1986, 329—343.
54. MALKAY D. — TIPS, 1982, 3, 496.
55. MARTIN T. F. J. — J. Biol. Chem., 1983, 258, 14816.
56. MARTIN W. R., EADES C., HAMOPSON J., GOLDBERT P. — J. Pharmacol. Exp. Therap., 1976, 197, 517.
57. MC NUTT N. S., HOFFSTEIN S. — Feder. Proc., 1981, 40, 206.
58. MICHELL R. — Biochem. Biophys. Acta, 1975, 415, 81.
59. MIDDLEBROOK J., KOHN L. — Receptor Mediated Binding and Internalisation of Toxins and Hormones, Academic Press NY, 1981, p. 1.
60. MOTULSKY H., INSEL P. — N. Engl. J. Med., 1982, 307, 18.
61. NICOLSON G. L. — Biochim. Biophys Acta, 1976, 457, 57.
62. NISHIZUKA Y. — Nature, 1984, 308, 693.
63. OKA T., NEGISHI K., SUDA M. — în Avnances on Endogenous and Exogenous Opioids, (sub red. H. Tagaki), Kodensha, Tokio, 1981, p. 21.
64. PALADE G. E., FARQUHAR M. G. — în Pathophysiology — The Biological Principles of Disease, (sub red. L. H. Smith J., S. O. Their), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1981, pp. 1—56.
65. PASTERNAK G. W. — Neurology, 1981, 31, 2311.
66. PAVANS DE CECCATTY M. — Communication et interactions cellulaires, PUF, Paris, 1983.
67. PRENKI M., CORKEY B., MATSHINSKIY F. — J. Biol. Chem., 1985, 260, 13777.
68. PUTNEY J. W., WEISS S. J., VAN DER VALLE C. M., HADDAS R. A. — Nature, 1980, 284, 344.
69. RALL T. W., SUTHERLAND E. W. — J. Biol. Chem., 1958, 232, 1065.
70. RAYNOUD J., BOUTON M., OJASVI T. — TIPS, 1980, 1, 324.
71. RITTENHOUSE S., SASSON J. — J. Biol. Chem., 1985, 260, 8657.
72. ROSEN O., KREBS E. — în „Protein Phosphorylation", (sub red. Rosen O.), Cold Springs Harbour Lab. N. Y., 1981, 8, 1.
73. RUOSLAHTI E., HAYMAN E. G., PIERSCHBACHER M. D. — Arteriosclerosis, 1985, 5, 581.
74. SALMON D. M., HONEYMAN T. W. — Nature, 1980, 284, 344.
75. SCHLESSINGER J. — TIPS, 1980, 5, 210.
76. SIMON E. — în Handbook of Neurochemistry, (sub red. A. Lajtha), Plenum Press N. Y., 1984, 6, 331.
77. SHYDER S. — N. Engl. J. Med., 1979, 300, 465.

Scanned with OKEN Scanner

VI. Citoscheletul normal și patologic

„ Este rezonabil să afirmăm că în 1976 circa 95% dintre cercetări ignorau faptul că în celulele vii există citoschelet ... În 1984, 95% îl recunosc, și mulți dintre ei consideră acum că citoscheletul joacă un rol fundamental într-o mare varietate de fenomene biologice".

W. BIRCHMEIER (1984)

Delimitarea frontierelor membranei este tot atît de dificil de stabilit la nivelul zonei sale interne, citoplasmatice, ca și la exteriorul său. adică al suprafeței celulare. Astfel, în zona subiacentă biomembranei a fost pusă în evidență o rețea complexă de filamente proteice situate în citoplasmă, care sînt „osatura și mușchiul" celulei eucariote (5), citoscheletul celular. Rețeaua citoscheletului există, în alternative variabile și la procariote. Denumirea de citoschelet este considerată, de mulți cercetători, neadecvată, din cauza funcțiilor multiple ale sistemului, deopotrivă dinamice și statice, ce controlează atît formele celulare, cît și mișcările de mare subtilitate ale unor molecule din membrană, din organitele citoplasmatice sau din întreaga celulă. Termenul este, deci, înșelător, deoarece principala funcție a structurii pe care o denumește nu este determinarea formei celulei printr-un schelet rigid, ci în primul rînd crearea unei organizări dinamice a citoplasmei. Au fost propuse chiar noi denumiri echivalente, ca *„motoschelet"* sau *„cinetoschelet"* (25), care însă nu au șansă se se impună, pentru că, de fapt, nici acestea nu cuprind toată complexitatea funcțiilor citoscheletului.

După descoperirea celulei o perioadă lungă de timp, aceasta era considerată ca un „sac" limitat de membrană și cuprinzînd un fluid neorganizat, citoplasma. Cu excepția unor evenimente foarte bine organizate, ca diviziunea celulară, totul părea să se desfășoare sub semnul întîlnirii aleatorii între organite și alți componenți citoplasmatici.

Ulterior, după 1920, observarea mișcărilor în celulele vii proba că organitele se deplasează într-o manieră ordonată, aproape previzibilă. Aceste constatări au permis unei întregi serii de cercetători din domeniul biologiei celulare, începînd cu R.Chambers (1926) și continuînd în prezent cu K.Porter să presupună structurarea citoplasmei printr-o rețea organizată care animă și ghidează organitele celulare. Chiar termenul de citoschelet a fost elaborat cu mult înaintea atestării existenței sale. Astfel, în 1928, Koltzoff preciza: „Fiecare celulă este un sistem de componente lichide și schelete rigide, care îi procură forma". Timp de mai multe decenii, termenul însă a fost abandonat, iar aspectele în favoarea existenței acestei structuri, din imaginile de microscopie, au fost interpretate drept artefacte (28). În ultimii ani această predic-

Scanned with OKEN Scanner

ție a devenit certitudine, printr-o largă cooperare interdisciplinară, posibilă datorită dezvoltării impetuoase a unor tehnici adecvate (5, 6, 8, 32, 40, 83, 98, 99).

Componentele fundamentale ale citoscheletului constau în 3 tipuri de filamente. Cele mai importante sînt *filamentele de actină* (denumite uneori și *microfilamente*) și *microtubulii* (alcătuiți din tubulină). Compuse din subunități proteice globulare, ambele se pot asambla și dezasambla rapid în celulă. La cea mai mare parte din celulele animale există o a treia clasă de filamente proteice, care, deoarece au un diametru intermediar între cel al filamentelor de actină și cel al microtubulilor, au fost denumite *filamente intermediare*. Constituite din subunități proteice fibroase, ele sînt mult mai stabile decît cea mai mare parte a filamentelor de actină și a microtubulilor. Dar structura citoscheletului crește în complexitate prin cuprinderea, în afara tipurilor principale de filamente enumerate și a *numeroase proteine accesorii diferite*, încă necunoscute în totalitate, pînă în prezent. Aceste proteine accesorii, foarte diverse, leagă filamentele între ele sau cu alte componente celulare și în primul rînd cu membrana celulară, ori influențează viteza și amploarea polimerizării filamentelor (fig. 1).

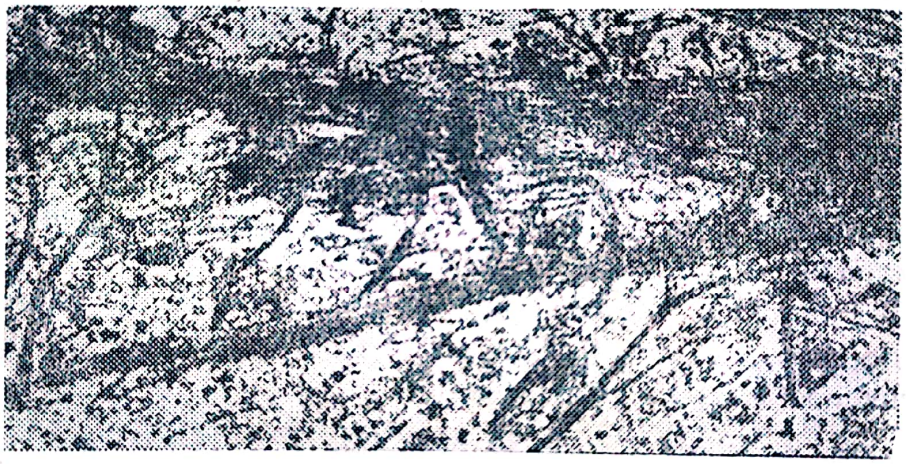


Fig. VI. 1 — Celulă epitelială de la șoarece (micrografie electronică × 3400) în citoplasma căreia se observă rețele de filamente aparținînd citoscheletului. Cele trei tipuri de filamente ale matricei celulare se disting prin diametru și aspect: a) fibrele drepte ce traversează imaginea sub forma unor fascicule groase sînt microfilamentele (cabluri) de actină: b) fibrele izolate, mai groase, reprezintă microtubulii; c) fasciculele curbe sînt constituite de filamente intermediare, a căror compoziție variază în funcție de tipul celular: în celulele epiteliale ele sînt alcătuite din keratină, (După K. Weber, M. Osborn, 1985) (67).

De dată recentă, K.R. Porter și colab., au pus în evidență, prin microscopie electronică la tensiune foarte înaltă, o structură fibrilară mult mai fină decît cele 3 componente enumerate anterior și a unei rețele *microtrabeculare*. Existența acestei rețele rămîne deocamdată în curs de clarificare.

Se pot distinge o serie de caracteristici generale ale componentelor celor 3 tipuri distincte, enumerate anterior, pe care le prezentăm sintetic în tabelul I.

Caracterele biochimice și imunologice ale proteinelor constituind rețeaua de microfilamente (actină) sau de microtubuli (tubulină) sînt foarte omogene de la un țesut la altul. Dimpotrivă, proteinele constitutive ale rețelei de fi-

TABEL I

Organizarea citoscheletului

	Diametrul	Proteine componente	Efectul unor medicamente
Microfilamente	60 Å	— actină (α, β, γ) — proteine asociate	— depolimerizare prin citocalazină
Microtubuli	240 Å	— tubulină (α, β) — proteine asociate	— depolimerizare prin colchicină; — cristalizare prin vinblastină
Filamente intermediare	100 Å	— foarte eterogene, cel puțin 5 clase diferite	— redistribuire perinucleară prin colchicină și vinblastină.

lamente intermediare sînt foarte eterogene, pînă în prezent fiind recunoscute 5 clase (Tabel II). Această diversitate poate fi considerată drept expresia originii embrionare a celulei studiate: mezenchimală, ectodermică sau endodermică. În funcție de nivelul de diferențiere atins, unele celule conțin exprimate tipuri diferite de filamente intermediare. De exemplu, mioblastele sintetizează exclusiv vimentină, pentru ca apoi, cînd ele fuzionează pentru formarea de celule adulte, să producă predominant desmină.

În continuare ne vom referi, pe scurt, la următoarele aspecte: 1) structura moleculară a filamentelor și a rețelei microtrabeculare. 2) Organizarea moleculară și dinamica citoscheletului. 3) Particularități ale citoscheletului la o serie de tipuri celulare. 4). Funcțiile citoscheletului. 5) Patologia moleculară prin modificări ale citoscheletului.

TABEL II

Distribuția tisulară a celor 5 clase de filamente intermediare

	Masă moleculară (daltoni)	Distribuție tisulară
Vimentină	56.000	— fibroblaste, condrocite, mușchi neted arterial, celule endoteliale, celule Schwann
Desmină	50.000	— mușchi striat, mușchi neted
Proteină glială acidă	50.000	— astrocite
Triplet de neurofilamente	200.000 170.000 70.000	— neuroni
Citocheratine	45.000 60.000	— epitelii cheratinizate și necheratinizate, stratificate și nestratificate (în afară de cristalin)

Scanned with OKEN Scanner

1. STRUCTURA MOLECULARĂ A FILAMENTELOR ȘI A REȚELEI MICROTRABECULARE

Microtubulii reprezintă primele elemente moleculare cărora le-a fost atribuită apartenența la citoschelet (52, 87). Deoarece tehnicile „dure" de fixare cu traoxid de osmiu dezorganizau aceste structuri, făcînd dificilă observarea lor în microscopie electronică, abia după anul 1963, prin introducerea de către D.D. Sabatini a fixării cu glutaraldehidă, microtubulii au fost puși în evidență în toate celulele eucariote.

Microtubulii sînt tuburi cilindrice cu un diametru de 20—30 nm și lungime foarte variabilă, de la cîteva zecimi de micrometru, pînă la cîțiva micrometri. Funcție de comportamentul în cursul fixării chimice, în vederea examinării prin microscopie electronică, există două mari grupe de microtubuli: *labili*, conservați numai prin fixare aldehidică (de exemplu, glutaraldehidă), la peste 4°C și *stabili*, prezervați indiferent de natura fixatorului și temperatura de fixare.

Fiecare microtubul reprezintă o structură polimerică edificată din subunități globulare de tubulină. Această proteină are greutatea moleculară de aproximativ 110.000—120.000 daltoni și reprezintă un dimer, alcătuit dintr-o subunitate α și alta β, cu secvențe de aminoacizi comparabile. Prin legarea α — tubulinei de la o moleculă de tubulină cu β — tubulina de la un alt dimer rezultă, prin polimerizare, un protofilament. Din 13 asemenea protofilamente sub forma unui cilindru rezultă un microtubul (fig. 2). Asamblarea microtubulilor din dimerii de tubulină este dirijată de locuri de orientare de la nivelul centriolilor, corpusculilor bazali ai cililor și centromerilor.

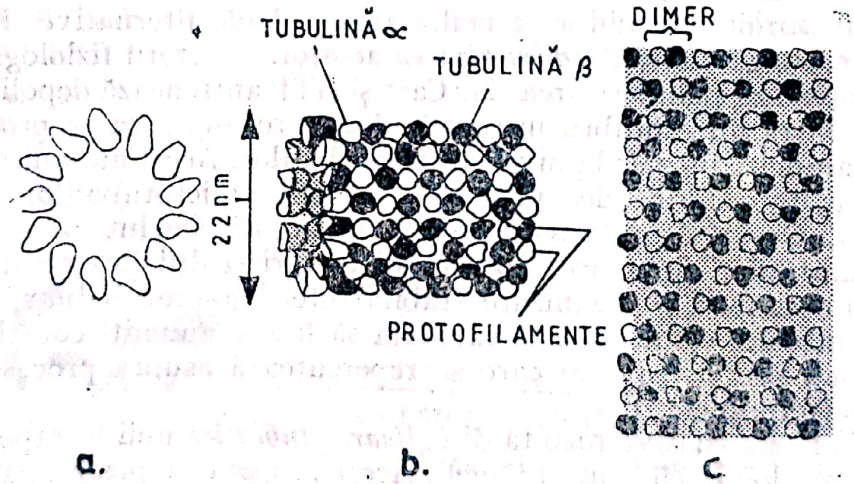


Fig. VI. 2 — Reprezentare schematică a asamblării tubulinei rezultată prin asocierea de dimeri din α și β tubulină în protofilamente; 13 protofilamente se dispun sub forma unui cilindru. Rezultă un microtubul cu diametrul de 22 nm, figurat în schemă prin extremitatea sa (a), din profil (b) și derulat (c).

Microtubulii labili sînt adesea paraleli între ei și se observă în citoplasma corticală precum și în axul prelungirilor celulare. Ei pot fi de asemenea dispuși în jurul centriolilor din celulele în interfază, sau la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

polilor la celulele în diviziune. Microtubulii stabili sînt în general asociați în edificii complexe, dintre care cele mai tipice sînt centriolii și axonema cililor flagelatelor.

Microtubulii se asamblează spontan cînd concentrația în tubulină depășește o anumită valoare critică. La o concentrație superioară acestei valori, moleculele de tubulină polimerizează, elongarea oprindu-se cînd concentrația proteinei scade sub valoarea critică. S-a demonstrat că subunitățile de tubulină sînt adăugate continuu la o extremitate a microtubului (notată cu +), în timp ce ele se pierd continuu la cealaltă extremitate (notată cu —). Polimerizarea este indusă de GTP, pe fiecare dimer de tubuline fixîndu-se două molecule ale acestui nucleotid, la extremitatea +. Energia disponibilă a GTP se eliberează foarte rapid, astfel încît moleculele de tubulină ale capătului — vor conține doar GDP.

Prezintă interes acțiunea unor agenți chimici care influențează polimerizarea microtubulilor. Cel mai cunoscut este alcaloidul vegetal colchicina, care pentru acțiunea sa de perturbare a diviziunii celulare este utilizată în chimioterapia cancerului (10). S-a demonstrat că efectul antimitotic al colchicinei, ca și al compusului derivat denumit colcemid, este datorat fixării pe moleculele de tubulină. Prin aceasta se depolimerizează fusul de diviziune celulară și se perturbă diviziunea nucleului. Acțiuni asemănătoare au vinblastina și vincristina. Au mai fost izolați și alți alcaloizi cu efect comparabil, după cum există și compuși sintetici, ca nocodazolul, cu acțiune asemănătoare. Dimpotrivă, un alcaloid denumit taxol, extras din tisa americană, diminuează cantitatea de apă asociată tubulinei și favorizează polimerizarea tubulinei. O acțiune similară are și apa grea. Efectul final va fi tot o blocare a mitozei, de astădată datorită imobilizării microtubulilor, prin stabilizarea suplimentară introdusă. Toate aceste substanțe sînt evident, de o mare utilitate pentru experimentatori, în înțelegerea modului de acțiune a microtubulilor.

Dinamica microtubulilor se realizează în două alternative. Prima este legată de *polimerizarea și depolimerizarea* acestora. Factorii fiziologici ca Mg^{2+} și GTP favorizează polimerizarea, iar Ca^{2+} și GTP antrenează depolimerizarea. Uneori nu există un echilibru între cele două procese, ceea ce produce o reducere sau alungire inegale la nivelul microtubulilor. Acest mecanism depinde, de asemenea, de o serie de proteine asociate microtubulilor (MAPs — *microtubules associated proteins*) și proteinele tau, ambele intervenind la asamblarea subunităților globulare. Toți acești factori și alții în curs de izolare și caracterizare, conferă o organizare stabilă rețelei microtubulilor, care, situată sub membrana celulară, este capabilă să fixeze anumiți constituenți glicoproteici sau proteici, fixare care se repercutează asupra proceselor de la nivelul biomembranei.

O a doua alternativă rezultă din *glisarea tubulilor* unii în raport cu alții, proces care are loc în cili sau în flageli. Acest proces este posibil datorită unei molecule complementare, dineina, aptă să stabilească punți intertubulare, realizînd un gen de angrenaje mobile.

Din alternativele menționate rezultă rolurile microtubulilor în celulă, *structural* și *dinamic*. Rolul *structural* constă în determinarea formei celulei (uneori prin participarea și a altor componente moleculare), organizarea geometriei spațiale celulare prin dispunerea relativ fixă a organitelor celulare, ca și organizarea globală a citoscheletului. În anumite etape de dezvoltare a celulei, microtubulii ar forma „schele temporare" prin intermediul cărora

Scanned with OKEN Scanner

celula își construiește anumite structuri particulare. De exemplu, în timpul dezvoltării cozii spermatozoidului apar microtubuli dispuși spiralat în jurul axonemei, apoi aceștia dispar, lăsînd în locul lor mitocondrii aranjate în spirală în jurul aceleiași axoneme, căreia îi furnizează ATP necesar mișcării flagelului.

Cel de al doilea rol, *dinamic*, stă la baza tuturor mișcărilor celulare și este datorat sistemului molecular microtubuli/dineină.

Pornind de la modalitățile de bază menționate anterior, uneori intervențiile funcționale ale microtubulilor sînt mai complexe. Astfel, s-a observat că o serie de componenți fundamentali ai membranei limfocitelor B, ca anticorpi, receptori diverși, antigene de histocompatibilitate se pot deplasa lateral în stratul bilipidic. În anumite condiții (de exemplu la 4°C) aceștia își modifică distribuția topografică normală, reunindu-se în grupe mici *(clusters-ciorchini)*, grupe mari *(patches)*, pînă la constituirea unei calote unice *(cap)* la un pol al celulei (fig. 3). Pentru urmărirea mobilității proteinelor se pot utiliza marcheri radioizotopici, de fluorescență sau opaci la electroni. Gruparea moleculelor în variantele enumerate se menține ca atare, mozaicul membranar apare rigidizat, iar elementele componente par ancorate în profunzime. Această „vitrificare" dispare cînd celulele sînt tratate cu colchicină, care depolimerizează microtubulii. Fenomenul sugerează că ei sînt implicați în procesul de ancorare, deoarece componentele membranei își reiau dinamica în momentul cînd situsurile de fixare tubulară sînt suprimate. Se demonstrează astfel că microtubulii prezintă relații structurale cu membrana plasmatică, încă insuficient clarificate (fig. 4).

6.2. Filamentele de actină sau microfilamentele

Filamentele de actină sau microfilamentele au fost detectate în celule la finele anilor 1970, sub forma unor filamente cu diametrul de circa 7 nm, denumite din acest motiv microfilamente. Microfilamentele formează fascicule

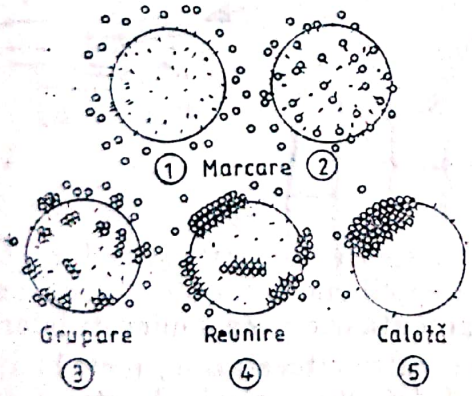


Fig. VI. 3 — Fenomenul de „capping".

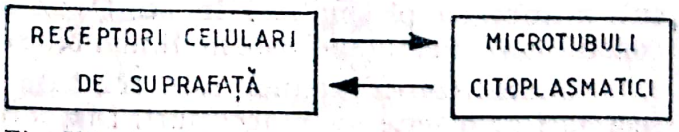


Fig. VI. 4 — Interacțiunea dintre receptorii celulari de suprafață și microtubulii citoplasmatici este reciprocă.

în zonele unde celula este alungită, sau rețele în zona apropiată membranei, în numeroase celule. Principalul constituent al microfilamentelor este neîndoielnic foarte apropiat că structură de actina din fibrele musculare În afara actinei din mușchiul scheletic, în celulele vertebratelor se sintetizează

Scanned with OKEN Scanner

încă 5 tipuri de actină, cu diferențe infime. Se poate astfel afirma că moleculele de actină de origine radical diferită sînt funcțional identice. Iată deci că o proteină considerată pînă recent specifică mușchiului, este regăsită de fapt în toate celulele nemusculare. Actina este o proteină globulară, cu greutatea moleculară de circa 42 000. Ea se poate menține în celule sub forma unor globule dispersate, monomerice, denumită forma globulară sau actina G. În acest caz ea este combinată cu altă moleculă, profilina, cu care dă profilactina. Forma sa, comparabilă cu o pară, este stabilizată de un ion de Ca^{+2}, actina G avînd o lungime de 6,5 nm și o lățime maximă de 4 nm (fig. 5) La actina G legată necovalent o moleculă de ATP. În prezența ATP și a Mg^{2+} profilactina se disociază și actina se polimerizează în microfilamente de circa 7 nm diametru. Rezultă actina filamentoasă sau actina F. Polimerizarea decurge la început lent, pînă cînd două sau trei molecule de actină iau o conformație geometrică specifică, apoi procesul se produce rapid, pînă la scăderea numărului monomerilor de actină, ca și în cazul microtubulilor, la o concentrație critică. Microfilamentele rezultate (sau actina F) constau din două lanțuri moleculare de actină G, înfășurate unul în jurul celuilalt, formînd o dublă elice răsucită spre dreapta, cu pasul spiralei de 70—80 nm. Monomerii de actină G sînt înșirați ca perlelele într-un șirag. Capetele filamentelor de actină sînt diferite, adică au o polaritate.

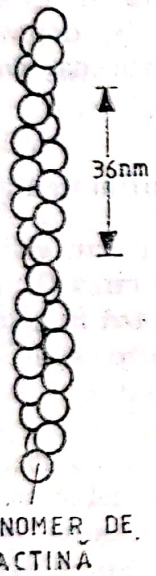


Fig. VI. 5 — Desen schematic al unui filament de actină, arătînd dispunerea elicoidală a moleculelor globulare de actină.

Actina F se organizează în teritorii citoplasmatice diferite și îndeosebi sub membrana plasmatică. În acest caz legarea filamentelor de actină cu constituenții membranei este mult mai bine cunoscută decît cea a microtubilor.

Polimerizarea actinei este inhibată de către citocalazine, metaboliți secretați de o serie de mucegaiuri. Dimpotrivă, faloidina, alcaloid extrem de toxic conținut de ciuperca *Amanita phalloides*, inhibă depolimerizarea, stabilizînd astfel filamentele de actină.

Actina prezintă trei modalități de funcționare. Prima modalitate corespunde polimerizării, adică transformării reversibile actină G actină F. Actina G nu permite nici o structurare, fiind mai mult o formă de rezervă decît o moleculă activă. Modul secund privește actina F, care poate antrena o

Scanned with OKEN Scanner

reticulare-dereticulare a moleculelor sale. Aceasta depinde de punțile moleculare care crează o rețea rigidă, scheletică, conferind citoplasmei consistența unui gel. Reticularea este controlată de molecule ca gelsolina (fig. 6). Punțile se pot rupe și astfel filamentele nu mai sînt imobilizate unele prin altele, devenind libere să interacționeze cu alte molecule și să se miște. Citoplasma devine mai fluidă, trecînd în starea de sol.

În fine, o a treia modalitate de funcționare pune în joc filamentele libere de actină F. Ea constă într-o fasciculare-defasciculare, vizibilă ușor *in vitro*. Microfilamentele independente se reunesc și se orientează paralel în fascicule,

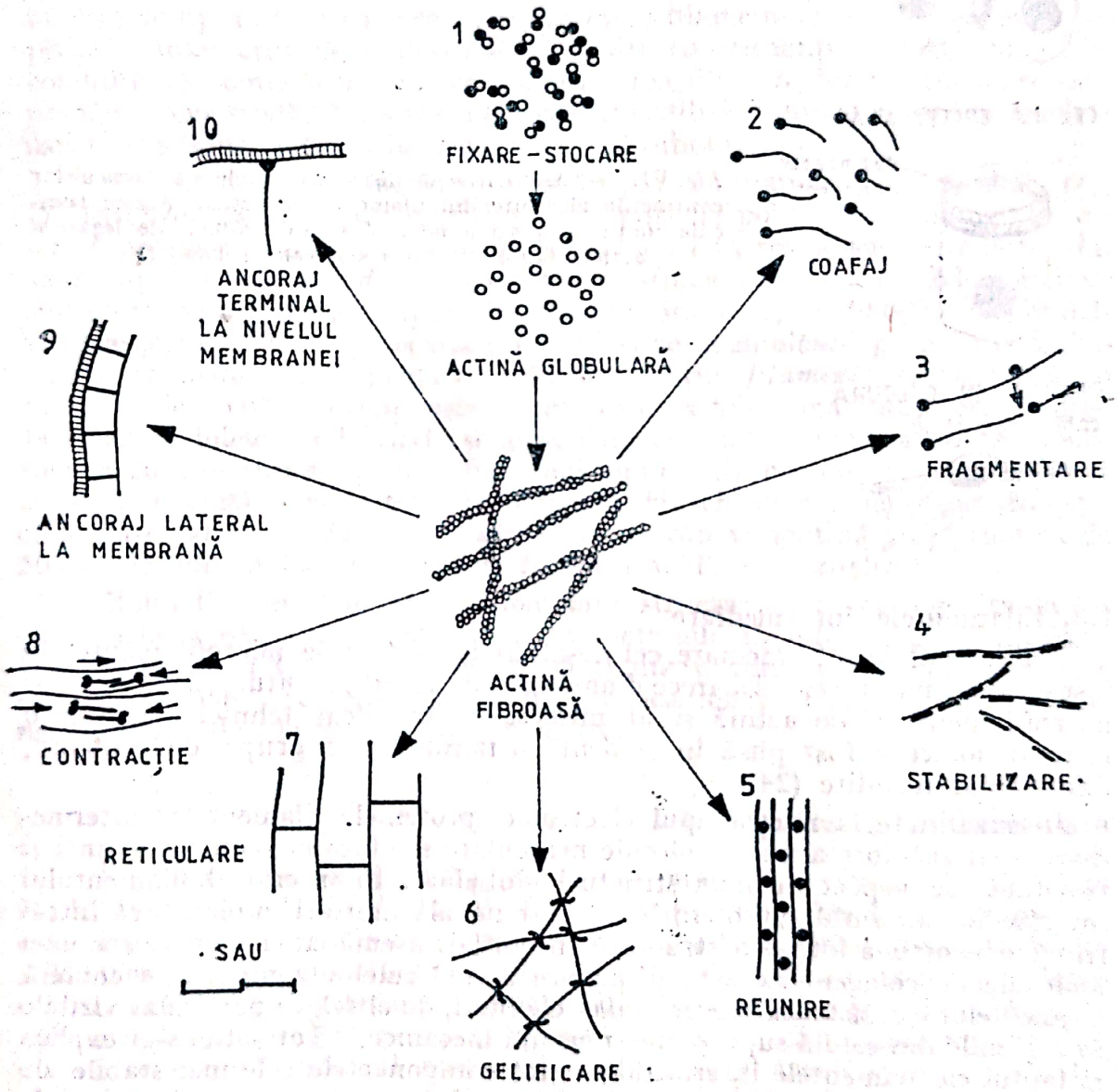


Fig. VI. 6 — Influența proteinelor legate de actină asupra organizării și funcțiilor acesteia.

dispuse în vecinătatea membranei plasmatice. În cazul celulelor în cultură acestea sînt denumite fibre de stres (fig. 7). Aceleași microfilamente de actină se găsesc și în prelungirile cu caracter temporar ale celulei (59).

În celulele nemusculare microfilamentele au un rol structural sau de susținere și unul dinamic, în mișcările celulare ce au la bază mecanismul molecular actină-miozină. De aici caracterizarea de „ansambluri intracelulare asemănătoare mușchilor" (6), moleculele de actină fiind asociate sistematic cu cele de miozină.

Fig. VI. 7 — Alternative de dispunere în celule a fasciculelor contractile alcătuite din filamente de actină. Aceste fascicule conțin deopotrivă miozină și alte proteine de legare a actinei (după B. Alberts și colab., 1986) (5).

1.3. Filamentele intermediare

Filamentele intermediare, cel de-al treilea sistem de microfilamente, au fost descrise mai recent deoarece diametrul lor, 10 nm, se situează între cel al microfilamentelor de actină și al microtubulilor. Prin tehnici biochimice și imunologice a fost pusă în evidență o familie de 5 grupe de proteine, diferite dar înrudite (24).

Examinate la microscopul electronic, proteinele filamentelor intermediare apar sub forma unor molecule neregulate și filiforme, contrar actinei și tubulinei, cu aspect de mici structuri globulare. În interiorul filamentului intermediar ansamblat, proteinele fibroase par alăturate și împletite ca într-o frînghie pentru a forma o structură în cordaj, asemănătoare cu cea a unei molecule de colagen. Această dispunere a moleculelor componente conferă filamentelor o rezistență elastică mare ele fiind, de altfel, în particular vizibile în regiunile din celulă supuse unei tensiuni mecanice. Tot astfel s-ar explica și faptul că filamentele intermediare sînt componentele cele mai stabile ale citoscheletului, rezistînd la acțiunea detergenților sau soluțiilor cu forță ionică. Chiar termenul de citoschelet a fost imaginat, la început, pentru desemnarea acestor fibre anormal insolubile (6).

Dacă filamentele de actină și microtubulii sînt de o remarcabilă omogenitate din punct de vedere al compoziției, proteinele conținute în filamentele intermediare variază foarte mult în diferite celule, iar pentru același tip

celular, funcție de specie. Astfel, polipeptidele componente au greutăți moleculare între 40 000 și 210 000 daltoni. De exemplu, filamentele intermediare din neuronii vertebratelor conțin 3 tipuri de polipeptide de 70 000, 140 000 și 210 000 daltoni.

Nu se cunoaște precis modul în care sînt dispuse proteinele componente într-un filament intermediar, dar s-a emis ipoteza grupării acestora în serii de trei molecule, deci subunitatea filamentului ar fi un trimer. Deoarece fiecare polipeptid prezintă două zone distincte, cu organizare conformațională de tip α-helix, este posibil ca în aceste regiuni cele trei polipeptide ale trimerului să se înfășoare unele în jurul altora. Zonele din polipeptidele neorganizate în elice de tip α ar putea servi la stabilizarea filamentelor și, de asemenea, ar permite interacțiunea filamentelor cu alți constituenți citoplasmatici. În condițiile existente în citoplasmă, asamblarea filamentelor intermediare este probabil ireversibilă. Nu a fost demonstrat echilibrul dinamic între moleculele izolate și polimerizate, ca în cazul actinei și tubulinei (6).

Au fost descrise, pînă în prezent 5 tipuri de filamente intermediare (8): 1) *neurofilamentele*, constituite din trei tipuri de polipeptide enumerate anterior, asociate în triplet și care se presupune că au rol de susținere la nivelul axonului; 2) *filamentele de cheratină* (sau *tonofilamentele)* din celulele epiteliale sînt compuse din circa 20 tipuri de cheratine înrudite, de 40 000—70 000 daltoni; asigură rezistența mecanică a pielii și se acumulează pe măsura îmbătrînirii celulelor; 3) majoritatea celulelor conțin *filamente de vimentină*, o proteină de 55 000 daltoni; este cazul fibroblastelor, macrofagelor, condroblastelor, celulelor endoteliale și musculare netede; vimentina poate copolimeriza cu alte subunități specifice unui anumit tip celular; 4) *filamentele de desmină asociată cu vimentina* se află în mușchii scheletici și netezi (cu excepția celor vasculari); 5) *filamente gliale*, alcătuite din vimentină și o proteină de 50 000 daltoni, denumită proteina fibrilară acidă a nevrogliei.

Rolul filamentelor este predominant structural, iar eterogenitatea lor conduce la supoziția că ele intervin în interacțiunile din diferite tipuri celulare. Interacțiunea cu filamentele de actină și microtubuli s-ar realiza printr-o serie de proteine accesorii. Există, însă, deocamdată și aspecte funcționale necunoscute ale filamentelor intermediare.

1.4. Rețeaua microtrabeculară

Rețeaua microtrabeculară, a cărei punere în evidență de către K. R. Porter și colab. (56, 72, 73, 102) constituie un subiect de controverse, este vizibilă numai prin microscopie electronică la foarte înaltă tensiune (peste 1 000 000 volți). Microtrabeculele, cu diametrul de 4—6 nm ar forma o rețea extinsă în întreaga hialoplasmă, în ochiurile căreia se află apă și ioni. Această afirmație l-a determinat pe E. Macovschi să susțină că rețeaua microtrabeculară reprezintă suportul microscopic al materiei biostructurate (57). La nivelul microtrabeculelor ar fi suspendate organitele celulare și citoscheletul. Se afirmă că microtrabeculele ar adapta conținutul intracelular la fluctuațiile conținutului în apă, în sensul că atunci cînd apa pătrunde în celulă microtrabeculele se dilată, ele contractîndu-se la ieșirea apei din celulă. Pe un plan mai larg, E. R. Porter afirma că argumentul cel mai convingător în favoarea prezenței rețelei microtrabeculare este furnizat de faptul că structura este

Scanned with OKEN Scanner

sensibilă la variațiile formei celulei sau la modificările mediului. Astfel, la temperatură redusă (4°C) celulele în cultură devin sferice, formă în care cheltuielile de energie sînt cele mai reduse. Ori, această modificare se acompaniază de dislocarea progresivă a structurilor citoscheletice: mai întîi se dislocă microtubulii, apoi microfilamentele, pe cînd rețeaua se deformează, fără a se dezagrega complet. Se formează lacune ce permit mișcarea browniană (difuziune liberă) a organitelor citoplasmatice, fenomen observat la celulele aflate la temperatură joasă, dar și în cazul temperaturilor fiziologice. Dacă se readuce celula la 37°C, în doar 5 minute se produce o restructurare spectaculoasă a rețelei, care își regăsește morfologia inițială (52, 72, 73). O serie de alți agenți și factori, ca variațiile extreme de presiune osmotică, modificările concentrațiilor unor ioni (Mg^{2+} și Ca^{2+}), prezența inhibitorilor metabolici conduc, de asemenea, la modificări reversibile ale structurii rețelei. „Modificări atît de importante ale morfologiei, constată K. P. Porter, ar fi dificil explicabile dacă această rețea nu ar reprezenta decît un artefact de fixare a celulelor" (73).

1.5. Proteinele asociate citoscheletului

Una din cheile înțelegerii structurii și funcției citoscheletului constă în cunoașterea proteinelor asociate, descrise într-un număr cu adevărat impresionant în ultimii ani. În tabelul III prezentăm, după B. Geiger (1983) și W. Birchmeier (1984), o serie de proteine asociate citoscheletului (8, 32).

TABEL III

Proteine asociate citoscheletului

Proteina	G.M. subunități (asociere)	Sursă majoră	Proprietăți
Asociere cu actina:			
Actinogelină (1978)	115 000 (?)	Ascită Ehrlich	Ca^{+} — sensibilă, induce starea de gel a citoplasmei.
Acumentină (1982)			Dispusă la capetele microfilamentelor.
Ankirină (1978)		Eritrocit	Conectează citoscheletul eritrocitar cu membrana.
Brevină (1978)	90 000 (1)	Ser	Scurtează filamentele de actină.
Caldesmonă (1981)	150 000(?)	Mușchi neted	Se leagă de actină în prezența calmodulinei și Ca^{2+}.
Calmodulină (1973)	17 000 (148 aminoacizi)		Activator Ca^{2+} dependent al miozinkinazei.
Filamină (1975)	250 000(2)	Mușchi neted, macrofage și alte celule	Legare pe filamente F de actină, favorizează organizarea microfilamentelor în rețea tridimensională.
Fimbrină (1980)	68 000(?)	Microvili	Legare pe actină, prezentă în extensiunile membranei, sudează filamentele paralele în mănunchiuri.
Fodrină (1981)	240 000	Țesut nervos	Analog noneritroid al spectrinei determină asocierea citoscheletului cu membrana în diferite celule.

Scanned with OKEN Scanner

Proteina	G.M. subunități (asociere)	Sursă majoră	Proprietăți
Fragmină (1980)	43 000(1)	Physarum	Modulator Ca^{2+} dependent a actinei F.
Gelsolină (1978)	91 000(1)	Macrofage	Scurtează filamentele de actină F în macrofage, plachete și ser sub acțiunea Ca^{2+}.
Profilină (1977)	16 000	Splină, timus, creier	Se fixează de monomerii de actină și împiedică polimerizarea lor.
Vilină (1979)	95 000	Microvili	Sub acțiunea Ca^{2+} produce fragmentarea filamentelor, în absența Ca^{2+} reduce legarea filamentelor.
Vinculină (1979)	130 000(1)	Mușchi neted majoritatea celulelor în cultură	Prezentă în zonele de contact ale fibroblastelor, reduce legarea filamentelor de actină.
Asociere cu filamentele intermediare;			
Prechera tine (1972)	40000—68000	Epitelii (keratinizate și nekeratinizate).	Participă la remarcabila diversitate a țesuturilor; polipeptide multiple în țesuturile individuale.
Desmină (1976)	55 000	Mușchi (neted și cardiac)	Sub formă de filamente în mușchii scheletici și în unii mușchi netezi.
Filagrină (1977)			Agregarea filamentelor intermediare în microfibrile.
Plectina (1980)			Complex de greutate moleculară mare copurificat cu vimentina.
Proteina glială fibrilară acidă (1971)	51 000	Astrocite	Împreună cu vimentina alcătuiește filamente gliale.
Proteinele neurofilamentelor (1975)	68 000	Majoritatea celulelor, fără cele neuronale	Complex de 3 proteine care formează neurofilamentele.
Sinemina (1980)			Asociată cu filamentele de desmină.
Titina (1979)			„Schele" pentru microfibrile.
Vimentină (1978)	58 000	Celule mezenchimale	Formează filamentele intermediare în celulele mezenchimale (denumită și decamină).
Asociere cu microtubuli;			
Clatrina (1976)	630 000		Constituie zone clatrinice (rețele hexagonale cu subunități de 630 kd) pe fața endocelulară a membranei plasmatice.
Dineina (1973)			Provoacă asocierea microtubulilor în dublete, iar prin intermediul ATP-azei mișcarea cililor.
MAP (1974)		Creier	*Microtubule-associated protein.*
MAP_1	340 000		(proteina asociată microtubulilor); 2 funcții, corespunzătoare la 2 fracțiuni; ancorare și asociere a microtubulilor (MAP_1) și polimerizarea tubulinelor (MAP_2).
MAP_2	270 000		
Nexina (1981)			Limitează alunecarea dubletelor și mișcarea cililor.
Proteina tau (1975)	55000—62 000	Creier	Produce agregarea simultană a mai multor dimeri de tubulină.

Această listă este în continuă extindere și revizuire, deci, are doar un caracter orientativ.

Scanned with OKEN Scanner

2. ORGANIZAREA MOLECULARĂ ȘI DINAMICA CITOSCHELETULUI

Examenul la microscopul electronic clasic, prin transmisie, chiar dacă oferă o rezoluție bună nu permite o observare globală a citoscheletului. Obstacolul limitant este reprezentat de faptul că o secțiune fină este de 200 de ori mai subțire decît o celulă, la secțiuni mai groase existînd riscul reținerii electronilor în preparat, ceea ce conduce la distrugerea sa instantanee, prin absorbția energiei electronilor accelerați.

Noile microscoape electronice, cu tensiuni de accelerare a electronilor foarte înalte, permit studiul unor secțiuni mai groase și ca urmare filamentele citoscheletului pot fi urmărite pe lungimi mai mari. A devenit, de asemenea, posibilă observarea globală a citoscheletului la microscopul electronic, prin tratarea celulelor cu un detergnt slab, neionic. Detergentul permite eliminarea prin spălare a fosfolipidelor membranei și extragerea din citoplasmă a proteinelor solubile, lăsînd intacte microfilamentele, microtubulii și filamentele intermediare. Astfel de preparate sînt net mai puțin absorbante și fac posibilă evitarea secțiunilor subțiri înainte de examinarea lor prin microscopie electronică (12, 99). Filamentele de actină și filamentele intermediare păstrează poziţiile lor normale, de asemenea, în condiții particulare se conservă și microtubulii. Diferitele tipuri de filamente sînt identificate datorită diametrului, ca și prin dispunerea subunităților proteice. Dimpotrivă, în celulele netratate cu detergent, rețeaua citoscheletică are un aspect mult diferit. Celulele sînt examinate și global, prin microscopie electronică la înaltă tensiune, sau prin criodecapaj. În acest caz, filamentele citoscheletului apar interconectate printr-o rețea tridimensională foarte întinsă de filamente fine, alcătuită probabil din proteine care la tratarea celulelor cu detergenți erau eliminate (fig. 8). Aceasta ar putea fi rețeaua microtrabeculară, dar nu se poate exclude nici alcătuirea sa din macromolecule solubile agregate în cursul fixării și deshidratării. Localizarea componentelor citoscheletului a fost precizată cu ajutorul unor anticorpi specifici pentru diferite tipuri de proteine. Complexele rezultate sînt apoi revelate prin anti-anticorpi la care se atașează o substanță fluorescentă, de obicei fluoresceina. Iluminarea cu radiații ultraviolete permite reperarea locurilor de fixare ale anticorpilor secunzi și, implicit, ale anticorpilor primari fixați pe o anumită proteină. Această tehnică a fost utilizată mai întîi pentru vizualizarea actinei (51), dar ca urmare a rezoluției reduse a microscopului optic, ulterior s-a adaptat aceeași tehnică pentru examinarea în microscopie electronică. În acest caz, anticorpii secundari sînt marcați cu peroxidază sau aur coloidal, marcheri reperabili în microscopia electronică, deoarece absorb electronii.

Tehnicile de microscopie nu oferă însă decît o imagine statică, un instantaneu al celulei în momentul fixării sale chimice. O serie de tehnici noi au avantajul de a furniza informații asupra comportării citoscheletului în celula vie. Astfel s-au dezvoltat tot mai accentuat, în ultimii ani, tehnicile de microinjecție în celulele vii a unor proteine citoscheletice marcate fluorescent, sau microinjecția de anticorpi specifici acestor proteine, ori chiar de ARNm specific citoscheletului. Proteinele microinjectate (de exemplu, actină, α-actinină, tubulină) sînt integrate rapid și în întregime în structurile celulare

Scanned with OKEN Scanner

native (5,41). Prin încorporarea proteinelor fluorescente se obțin date precise referitoare la localizarea acestora în citoschelet, dar și informații cu privire la ritmul de reînnoire al structurii. Un marker fluorescent permite, pe un amplificator de imagine prin intermediul unei camere video, urmărirea incorporării unei proteine în matricea citoplasmatică. Se speră că tehnicile de microinjecție combinate cu măsurări adecvate de diminuare a fluorescenței și de microspectrofluorimetrie să ofere o nouă imagine a dinamicii citoscheletului. O perspectivă deosebită este deschisă prin posibilitatea analizei moleculare a genelor care controlează sinteza componentelor citoscheletice (40).

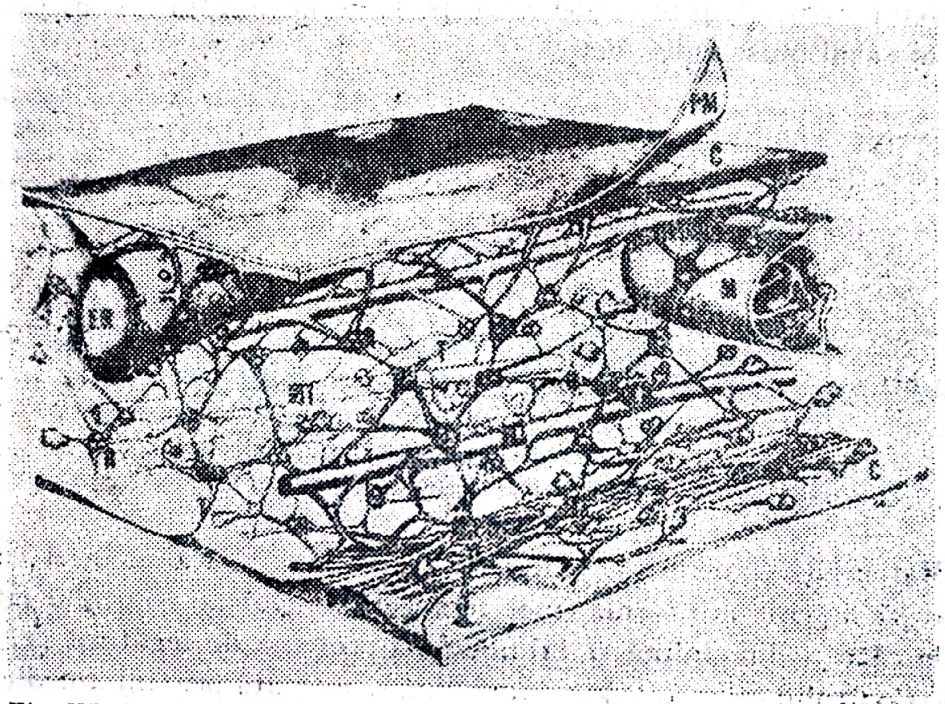


Fig. VI. 8 — Un model al arhitecturii citoscheletului: străbătînd întreaga citoplasmă rețeaua microtrabeculară intră în contact sub membrana plasmatică (PM) cu o zonă periferică denumită cortex (C). În interiorul celulei, rețeaua este în contact cu membranele intracelulare (ER), microtubuli (MT) și cu filamentele de actină (SF). Ribozomii (R), figurați sub forma unor mici sfere, sînt acrosați la rețeaua microtrabeculară. Această organizare cuprinde toate organitele cu excepția mitocondriilor, care sînt legate doar la microtubuli. Modelul rămîne ipotetic, deoarece existența rețelei microtrabeculare este disputată. (După J. J. Wolosewick și K. R. Porter, 1979) (102).

Din datele obținute, reprezentarea actuală a citoscheletului constă dintr-o rețea tridimensională de filamente proteice și microtubuli extinsă în întreaga hialoplasmă, intersectîndu-se în toate direcțiile, *extrem de dinamică*, modificîndu-se în funcție de diferitele etape ale activității celulare.

Pînă în prezent au fost puși în evidență mai mulți factori determinanți ai dinamicii citoscheletului (28). Primul element ține de continua polimerizare-depolimerizare a tubulinei din microtubuli și a actinei din microfilamente. Au fost izolate o serie de proteine din citosol care reglează această polimerizare-

Scanned with OKEN Scanner

depolimerizare. Dintre cationi, Ca^{2+} joacă un rol esențial. Membrana celulară împiedică pătrunderea Ca^{2+} în celulă, în interiorul celulei cationul este sechestrat în mitocondrii sau în vacuole specifice, iar în cazul mușchiului în reticulul sarcoplasmic. Ionul de Ca acționează prin intermediul unor proteine, calmodulina (polipeptid format din 148 de aminoacizi) fiind considerată un autentic receptor intracelular unic pentru cation. Ponderea calmodulinei este importantă, ea reprezentînd prin cele 10^7 molecule existente în orice celulă animală, 1% din totalul proteinelor celulare (6). Calmodulina, la rîndul său, își exercită acțiunea printr-o serie de proteine de legătură, cum este caldesmona în cazul mușchiului neted.

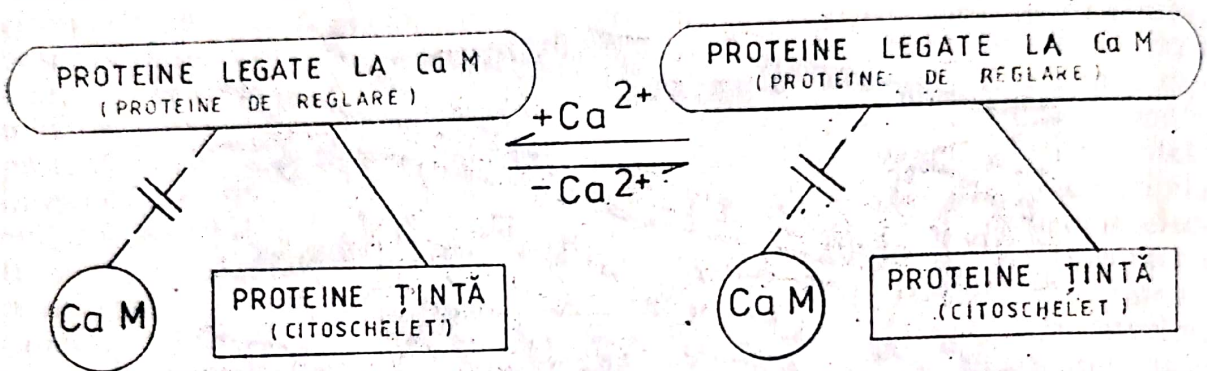


Fig. VI. 9—Mecanismul *„flip-flop"* de reglare a citoscheletului, dependent de calmodulină (CaM) și Ca^{2+} (După S. Kakiuchi și K. Sobue, 1983) (47).

Mai mulți cercetători, îndeosebi K. Sobue, S. Kakiuchi și colab., au încercat să descrie sub forma unor reprezentări globale controlul citoscheletului de către calmodulină și calmodulină-proteine de legătură (47, 48, 67, 89, 90). Controlul exercitat de calmodulină se exercită prin intermediul a două grupe de proteine legate la aceasta. Spectrina (eritrocitară) și proteinele asemănătoare spectrinei (spectrina noneritroidă, detectată și analizată în creier, dar prezentă și în alte țesuturi) constituie prima grupă. Cea de a doua constă din proteina tau (microtubuli cerebrali), caldesmonă (mușchi neted) și proteina cu greutate moleculară 135 000 (mușchi neted). Aceste proteine interacționează cu calmodulina și cu componentele citoscheletului (tubulină sau actină) funcție de concentrația de calciu, printr-un mecanism de *„flip-flop"* (fig. 9). Dinamica citoscheletului este influențată și de nucleotide, în primul rînd de AMP-ciclic, care, favorizînd plimerizarea microfilamentelor și microtubulilor, modifică forma și motilitatea celulelor (104). Influențele hormonale, de exemplu de la nivelul celulelor tiroidiene în cultură, pot fi explicate tot pe această cale (100).

Influența în acest caz este reciprocă, criteriile implicării citoscheletului în cascada mecanismului celui de al doilea mesager sînt prezentate în tabelul IV. În același tabel sînt menționate doar cîteva din numeroasele lucrări care susțin experimental aceste criterii.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL IV

Criterii pentru demonstrarea relației citoschelet-sistem adenilatciclază-cAMP
(După U. Zor, 1983, modificat) (104)

Criterii	Referințe
1 — Citoscheletul poate fi asociat la sistem printr-un loc de fixare intracelular sau existent în membrana plasmatică.	33, 35, 38, 84
2 — Complexul hormon-receptor, GTP și adenilatciclaza pot fi asociate cu proteinele citoscheletului.	46, 78, 88
3 — Hormonii și cAMP pot modifica asamblarea, organizarea sau translocarea sistemului citoscheletic.	26, 46, 92
4 — Medicamentele, agenții și tratamentele inductoare de modificări ale ansamblului matricei citoscheletice pot mima, potența sau inhiba acțiunea hormonală.	22, 60, 82, 95
5 — Proteinchinazele și nucleotidciclic-fosfodiesteraza se pot lega la filamentele citoscheletului.	45, 80, 86

3. PARTICULARITĂȚI ALE CITOSCHELETULUI LA O SERIE DE TIPURI CELULARE

Expresia moleculară a citoscheletului poate fi sensibil diferită de la un tip celular la altul. Astfel, *eritrocitul matur* de om și de mamifere prezintă un citoschelet cu o organizare particulară. Întrucît rețeaua citoscheletică nu străbate întreaga celulă, fiind localizată în proximitatea membranei se acceptă denumirea de schelet al membranei eritrocitare (a se vedea cap. VII).

Leucocitele spre deosebire de eritrocite, conțin un citoschelet „clasic" alcătuit din microfilamente aranjate într-o rețea dispusă sub membrană, microtubuli originari din centrioli și întinzîndu-se radiar spre periferia celulei, precum și filamente intermediare, plasate lîngă nucleu și regiunea centriolară (66). Celulele hematopoietice, în ansamblul lor, reprezintă actualmente un model privilegiat pentru studiul eventualelor modificări de expresie a filamentelor intermediare în cursul proceselor de diferențiere și de maturație celulară, deoarece provin toate din aceeași celulă sușă (21).

În cazul *limfocitului* cunoașterea citoscheletului are o importanță particulară, datorită multiplilor receptori membranari cu care diferitele subpopulații limfocitare sînt înzestrate. La limfocitul neactivat rețeaua de microfilamente de actină este foarte densă (15, 53, 54, 63, 85).

Microfilamentele au un diametru de 6 nm și sînt decorate cu meromiozină. Prezența actinei a fost demonstrată prin imunofluorescență, ca și prin alte numeroase metode biofizice și biochimice (29, 42, 46). Ca proteină asociată microfilamentelor a fost identificată miozina, distribuită cortical (42).

A fost detectată, de asemenea, o familie de proteine asemănătoare spectrinei, care prezintă un interes particular, datorită capacității de fixare a actinei și a calmodulinei (68). Alte proteine accesorii microfilamentelor cuprind :

Scanned with OKEN Scanner

α-actinina, filamina și tropomiozina (39). Prin metode ultrastructurale și de munofluorescență au fost relevați microtubulii și filamentele intermediare de tip vimentină (103).

Citoscheletul limfocitar este concentrat în imediata vecinătate a membranei, într-o dispunere uniformă lacunară și poate fi extras, ca și în cazul altor celule cu detergenți neionici. Reziduul obținut după extracție, „fantoma" limfocitară insolubilă la detergenți, prezintă mișcări ameboide consecutiv adăugării de Mg^{2+} și de ATP (64).

Unul din fenomenele cele mai relevante ale mozaicului fluid membranar de „*capping*" a fost oferit de membrana limfocitară. În urma interacțiunii antigenelor cu imunoglobulinele de suprafață (receptori) se produc modificări în structura membranei (aglomerarea receptorilor într-o zonă restrînsă a celulei, „*capping*"), este stimulată locomoția limfocitului, iar ulterior se produce endocitoza complexelor imunoglobuline-antigene. S-a demonstrat că toate aceste fenomene implică participarea citoscheletului. Suprafața limfocitului nu este netedă, prezentînd o serie de microvili. Expresia microvililor este abolită de citocalazină. Microvilii, ca și formarea veziculelor de pinocitoză, se află sub controlul citoscheletului (53, 55).

Controlul exercitat de către citoschelet asupra proteinelor, a incitat la conceperea unui nou model al organizării suprafeței celulare. A devenit clar faptul că distribuția neuniformă a anumitor componente ale membranei este un determinant major al funcțiilor metabolice și de recunoaștere specifică limfocitului. În acest sens F. Loor (1980) afirmă că membrana nu este un mozaic fluid omogen protido-lipidic, datorită controlului localizării unor componente de către citoschelet. El susține existența în plasmalemă a unor microdomenii, moleculele edificiului membranar fiind partajate în 3 clase: a) marea majoritate a moleculelor — clasa I — este liberă să difuzeze liber în planul membranelor; b), o serie de molecule, clasa a II-a, sînt ancorate la microfilamente direct sau prin intermediul α-actininei; devenind mobile doar după depolimerizarea microfilamentelor sau după disocierea acestora în raport cu membrana plasmatică; unele componente cu afinitate particulară pentru microfilamente continuă mișcarea la nivelul suprafeței celulare, de exemplu, de la un pol la altul al celulei; c) moleculele din clasa a III-a, mai reduse ca număr, sînt ancorate la nivelul microtubulilor, probabil, prin intermediul unor molecule intermediare; ele prezintă o mobilitate extrem de redusă, tipică microtubulilor și devin mobile după depolimerizarea acestora (53, 54).

Mai recent (1983), J. Braun și E. R. Unanue disting două clase fundamentale ale proteinelor din membrana limfocitului (v. tabel V). Prima clasă cuprinde o serie de proteine aflate în interacțiune strînsă cu citoscheletul ca imunoglobulinele, antigenul timic leucemic (marcher de diferențiere a timocitelor), receptorul F_c și Lit. 2, moleculă implicată în adeziunea celulelor T citolitice. Clasa a II-a de proteine este indirect corelată funcțional cu citoscheletul, fenomenele de redistribuire a receptorilor și endocitoză exprimîndu-se mai lent. De asemenea, sensibilitatea la modificările induse farmacologic la nivelul citoscheletului este mai redusă (14, 15, 85). Din clasa a II-a fac parte antigenele majore de histocompatibilitate, xenoantigenele majore (familia de glicoproteine 200) și marcherul universal al celulelor T murine (Thy 1).

Scanned with OKEN Scanner

TABEL V

Clase funcționale ale proteinelor de suprafață
(După J. Braun și E. R. Unanue, 1983) (15)

Proprietăți	Clasa I	Clasa II
Redistribuirea receptorilor (T 1/2)	3 min.	15 min.
Endocitoză (T 1/2)	5 min.	120 min.
Număr de liganzi	1	2
Segregarea miozinei	+	—
Motilitate	+	—
Sensibilitate la fenotiazine	+	—
Sensibilitate la ionoforul A 32187	+	—
Sensibilitate la inhibitorii metilării	+	—

Clasificarea are utilitate practică, în caracterizarea proceselor imune în care este implicat major limfocitul.

Fără să tentăm o trecere în revistă a tuturor particularităților organizării citoscheletului la diferite tipuri celulare, ne vom referi și la cîteva date noi asupra diversității citoscheletului în compartimentele *celulelor neuronale*. Cele mai multe cercetări recente se referă la descrierea spectrinei cerebrale, care este alcătuită din două subunități, α de 240 Kd și β de 235 Kd, reunite sub forma unui complex tetrameric $(\alpha\ \beta)_2$. Subunitatea α conține situs de legare pentru calmodulină, iar subunitatea β fosforilată conține locuri de legare pentru sindeină/ ankirină, cu potențial de atașare la membrană (7, 36, 37, 50, 79). Surprinzătoare și încă neexplicată este existența a două tipuri distincte de spectrină, repartizate diferit la nivelul celulelor neuronale. Primul tip de spectrină cerebrală (notat 240/235 este prezent în axonii neuronali, dar nu și în dendrite, în plus poate fi detectat imunochimic, cu anticorpi anti-spectrină. Tipul secund este notat 240/235 E, deoarece este recunoscut exclusiv de anticorpii anti-spectrină eritrocitară. În plus, acest al doilea tip este distribuit în corpul celular neuronal și în dendrite, ca și în unele celule gliale, dar nu este prezent în axoni și la nivelul terminațiilor presinaptice (79) (fig 10). Este evident că această distribuție asimetrică a celor două tipuri de spectrină poate avea consecințe funcționale importante, deocamdată în curs de studiu. Distribuția diferită implică și celelalte componente ale citoscheletului. Astfel, α și β tubulina sînt prezente atît în celulele neuronale cît și în cele gliale, dar în timp ce în dendrite și glie au fost puse în evidență amîndouă, β-tubulina diminuă la nivelul axonilor (94). În adiție, proteinele asociate microtubulilor, MAP1, MAP2 și MAP3 au, de asemenea, o localizare distinctă. MAP1 este prezentă în corpul celular, în segementul inițial al axonului și în ramificațiile dendritice ale celulelor Purkinje, lipsind din celulele gliale (9).

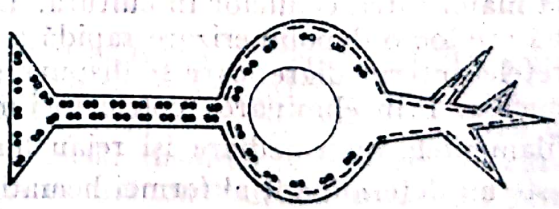


Fig. VI. 10 — Distribuția ipotetică a subtipurilor de spectrină în neuron; cerculețele duble reprezintă spectrina 240/235 concentrată în axon și mai redusă la nivelul corpului celular; liniuțele reprezintă subtipul de spectrină 240/235 E, localizat în corpul celular și în dendrite. (După B.M. Rierderer și colab., 1986) (79).

MAP2 sînt relevate doar în dendrite și nu în corpurile celulare sau în axoni (9). Dimpotrivă, MAP3 sînt prezente atît în celulele neuronale cît și în cele gliale, în neuroni fiind aglomerate exclusiv în axonii bogați în neurofilamente (44). Actina apare concentrată în dendrite și postsinaptic, prezentînd diferite forme izotipice (16).

Toate aceste date asupra caracteristicilor citoscheletului celulelor neuronale vor influența direct modalitățile de explicare la nivel molecular din domeniul neurofiziologiei.

4. FUNCȚIILE CITOSCHELETULUI

Din prezentarea componentelor și a organizării lor arhitecturale se pot contura o serie de funcții ale acestei structuri.

4.1. Menținerea formei celulare

Rolul său principal constă în *menținerea formei celulei* și a localizării precise a organitelor intracelulare. Dacă în interiorul celulei diferitele compartimente sînt delimitate de membrane, topografia intracelulară și redistribuția componentelor în funcție de nevoile metabolice se realizează prin dinamica citoscheletului.

Formele celulare extrem de diverse și uneori cu mare variabilitate, deși depind în primul rînd de citoschelet, se realizează din interacțiunea componentelor acestuia cu alte molecule, uneori specifice tipului celular considerat, precum și cu o serie de ioni, îndeosebi Ca^{2+}.

Există probe experimentale care atestă că microtubulii sînt organizatorii citoscheletului, cu un rol particular în determinarea geometriei celulare. Prezența lor este indispensabilă menținerii formei asimetrice a celulei. De exemplu, expunerea la colchicină oprește dezvoltarea în lungime a celulelor nervoase. Aceiaei microtubuli influențează repartiția filamentelor intermediare la majoritatea celulelor în cultură. Dacă se tratează fibroblastele cu colchicină are loc o depolimerizare rapidă a rețelei de microtubuli cu dezorganizarea rețelei intermediare, care se dispune sub forma unei calote filamentoase lîngă nucleu. Prin eliminarea colchicinei microtubulii se repolimerizează rapid, iar filamentele intermediare își reiau lent distribuția normală (5). Citoscheletul este un determinant al formei hematiei (a se vedea cap. VII).

4.2. Mișcările celulare

Toate *mișcările celulare* se efectuează din intervenția componentelor citoscheletului. Motilitatea celulară prezintă o multitudine de aspecte, de aceea devine necesară o clasificare a diferitelor categorii de mișcări celulare (tabelul VI) cu menționarea sistemului molecular ce stă la baza fiecăruia

Scanned with OKEN Scanner

TABEL VI

Categorii de mişcări celulare şi sistemul molecular ce asigură motilitatea
(După Gh. Benga, 1985) (6)

Categorii de mişcări celulare	Sistemul molecular implicat
1 — Mişcări din contracţia musculară.	actină-miozină
2 — Mişcări ce modifică raporturile dintre celulă şi mediul extern:	
a) mişcarea de locomoţie ameboidală	actină-miozină
b) mişcarea de locomoţie prin flageli	microtubul-dineină
c) mişcările cililor	microtubul-dineină
3 — Mişcări ce nu modifică raporturile celulă-mediu extern (mişcări intracelulare):	
a) mişcările din cursul diviziunii celulare	microtubul-dineină actină-miozină
b) mişcări din microvili	actină-miozină
c) curenţii citoplasmatici	microtubul-dineină

dintre acestea. În prezent este larg acceptată dependenţa proprietăţilor biomecanice şi de motilitate ale celulelor de acţiunea integrată a plasmalemei şi a citoscheletului.

O prezentare sintetică a mecanismelor moleculare corespunzătoare diferitelor categorii de mişcări celulare există într-o serie de lucrări recente (5, 8, 28).

4.3. Membrana celulară

Citoscheletul se află în strînsă relaţie structurală şi funcţională cu *membrana celulară*. Studiul legăturilor dintre citoschelet şi biomembrană se concentrează în esenţă asupra următoarelor aspecte: 1) identificarea moleculelor prin intermediul cărora citoscheletul este ataşat la membrana plasmatică; 2) demonstrarea experimentală a faptului că această legătură influenţează membrana atît în planul organizării sale moleculare cît şi din punct de vedere funcţional (32).

De exemplu, microvilii intestinali conţin fiecare în medie 40 filamente paralele de actină, cu polaritate identică şi care se termină la capătul microvilului respectiv într-o zonă ce stabileşte legătura cu membrana. Ataşarea la membrană se realizează printr-o zonă densă, insuficient cunoscută, care conţine α-actinină (fig. 11). Dezorganizarea mănunchiurilor de actină prin presiune crescută distruge microvilii. Prin exercitarea unei presiuni locale sistematice pe intestinul embrionului de găină sau prin administrarea de citocalazină B, se poate provoca o creştere a numărului de filamente şi a zonei de branşament microvili-biomembrană (24).

În general, investigaţiile ultrastructurale arată o ataşare directă a citoscheletului de plasmalemă, dar biochimia acestei zone este săracă în date concrete. Polaritatea structurală şi funcţională a elementelor din care este alcătuită zona de legătură a fost definită cel mai clar pentru unele microfilamente (97).

Scanned with OKEN Scanner

Un aspect tot mai clar pus în evidență este rolul citoscheletului în transmiterea unor informații prin intermediul biomembranei. În secvențele moleculare ale acestei relații se interpun frecvent o serie de proteine, încă neidentificate, sau insuficient cunoscute (41).

Unul din exemplele de interes deosebit în medicină îl reprezintă motricitatea celulară chimiotactică sau chemotactismul celular. Semnalele chimiotactice primite la nivelul membranei declanșează o migrare orientată a

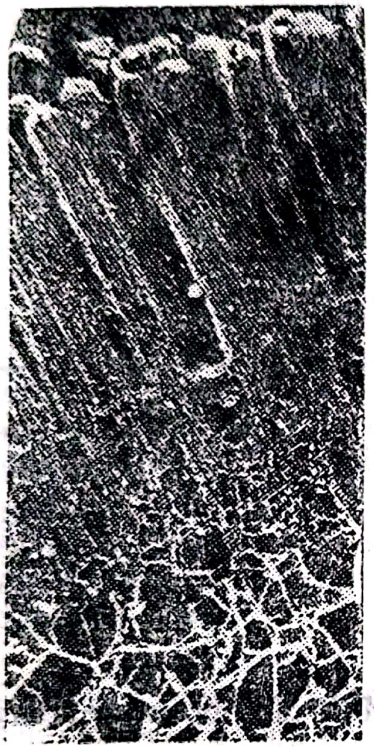


Fig. VI. 11 — Clișeu obținut după tratarea cu detergenți a celulelor epiteliului intestinal și criofractură urmată de examinare în microscopie electronică. Se observă citoscheletul cu cele 3 rețele de filamente și zona sa de atașare la membrană (După K. Weber și M. Osborn, 1985) (99).

celulelor, grație unui ansamblu de mecanisme, care relevă în primul rînd procese fundamentale de transducție. Cazul macrofagului este cel mai bine cunoscut. Această celulă prezintă un potențial de membrană de circa — 15 mV. Chemotaxia macrofagelor, adică atragerea lor către zonele infectate sau inflamate se produce numai sub acțiunea unor atractanți. Cel mai frecvent aceștia sînt reprezentați de un fragment de complement (C_{5a}), un peptid, N-Met f, o serie de molecule eliberate de bacterii, prostaglandina PGE_2, precum și unii factori eliberați de limfocitele B și T stimulate. De asemenea, în migrarea macrofagelor intervin și substanțele care inhibă motilitatea lor întîmplătoare și le fixează la locul inflamației. Se cunosc două clase de astfel de substanțe: limfokinele (elaborate de limfocite) și enzimele proteolitice rezultate în timpul activării complexului și a sistemului fibrinolitic (71). Moleculele de atractant se fixează la nivelul membranei macrofagului pe receptori specifici și nespecifici. După fixare se induce în 10 secunde o scurtă depolarizare, apoi o hiperpolarizare de ordinul —50 mV, care persistă 2—5 minute. Variațiile biocurenților reflectă mai întîi o pătrundere de Ca^{2+} (depolarizare) și apoi o ieșire de K^+ (hiperpolarizare). Rezultatul constă într-o creștere rapidă a Ca^{2+} care era fixat în rezervele citoplasmatice. Fluxul calcic antrenează sistemul contractil și motor al microfilamentelor de actină. La nivelul acestor ultrastructuri, Ca^{2+} intervine asupra unor molecule ca gelsolina, care controlează transformările reversibile ale reticulării-dereticulării microfibri-

Scanned with OKEN Scanner

lelor ce devin apte să interacţioneze cu miozina. Ca^{2+} favorizează această interacţiune şi glisarea filamentelor. Contracţia actomiozinei provoacă trecerea citoplasmei în starea de gel. Relaxarea sistemului actină-miozină va conduce la starea fluidă a citoplasmei. Din alternanţa celor două stări rezultă mişcarea ameboidală de locomoţie.

La celula plasată într-un gradient de chimioatractanţi, cantitatea de receptori adecvaţi ocupată de liganzii specifici nu mai este uniform repartizată pe toată suprafaţa celulară. Polul situat în amonte este mai stimulat decît polul în aval, ceea ce conduce la modificări de formă ale celulei, cu o polaritate marcată a organizării constituienţilor membranei, în particular la o concentrare a receptorilor, finalmente rezultînd o locomoţie dirijată. Fenomenul se produce cu participarea concomitentă a microtubulilor, care stabilizează orientarea celulei. Modificările citoscheletului nu se produc numai în consens cu deplasarea receptorilor, dar şi în raport cu punctele de ancorare celulară pe substrat (25). Procese similare cu cel descris în cazul macrofagului au loc şi în cazul chemotactismului leucocitar. În concluzie, cuplajul calcic efectuat între stimularea chemotactică prin atractanţi şi mobilitatea migratorie asociază receptorii şi citoscheletul în crearea unei polarităţi celulare şi realizarea unei deplasări orientate spre focarul de infecţie.

Dacă metilarea este blocată cu anumite substanţe, chemotactismul este inhibat şi deplasarea celulelor către focarul de infecţie nu se mai produce (6, 8). Este certă, de asemenea, relaţia dintre membrana celulară şi citoscheletul în determinarea adezivităţii celulare şi a inhibiţiei de contact. Deci citoscheletul interacţionează şi cu matricea extracelulară, ceea ce conduce la ideea că el posedă o schemă de organizare mai curînd conformă ansamblului unui ţesut, decît una independentă.

Problema cea mai dificilă rămîne cunoaşterea proteinelor care asigură continuitatea moleculară şi funcţională dintre citoschelet şi plasmalemă (fig. 12). În cazul filamentelor de actină, de exemplu, această interacţiune se realizează prin intermediul vinculinei, la care însă se asociază şi alte proteine încă necunoscute. Vinculina a fost identificată cu ajutorul anticorpilor fluorescenţi, atît în plăcile de adeziune din celule în cultură cît şi în desmozomi. Ea ar putea servi ca proteină de ancoraj legînd filamentele de actină de membrana plasmatică. S-a demonstrat că vinculina nu este o proteină membranară, servind probabil la legătura dintre actină şi un component intrinsec al membranei (6, 41).

Cel mai important aspect, a cărui cercetare aduce continuu date noi, rămîne rolul citoscheletului în transducţia coordonată a informaţiilor de la nivelul biomembranelor în zone specifice citoplasmei.

4.4. Organitele celulare

Relaţiile dintre citoschelet şi *organitele celulare* sînt, de asemenea, certe. Microtubulii, „organizatorii directori ai citoscheletului" (5) ca şi celelalte componente ale reţelei citoscheletice creează în celulă un sistem vacuolar cu numeroase compartimente şi subcompartimente, ceea ce atestă rolul structurii respective în menţinerea în poziţie într-o zonă celulară precisă a organitelor intracelulare. În acest sens, au fost puse în evidenţă asocieri ale micro-

Scanned with OKEN Scanner

filamentelor cu mitocondriile, ale nucleilor cu microtubulii și filamentele intermediare, ca și ale microtubulilor cu veziculele sinaptice.

Concomitent, o serie de organite, ca mitocondriile și lizozomii, prezintă o mișcare saltatorie, prin care se deplasează rapid în linie dreaptă, revenind apoi în poziția inițială, sau îndreptîndu-se în altă direcție. Pe micrografiile

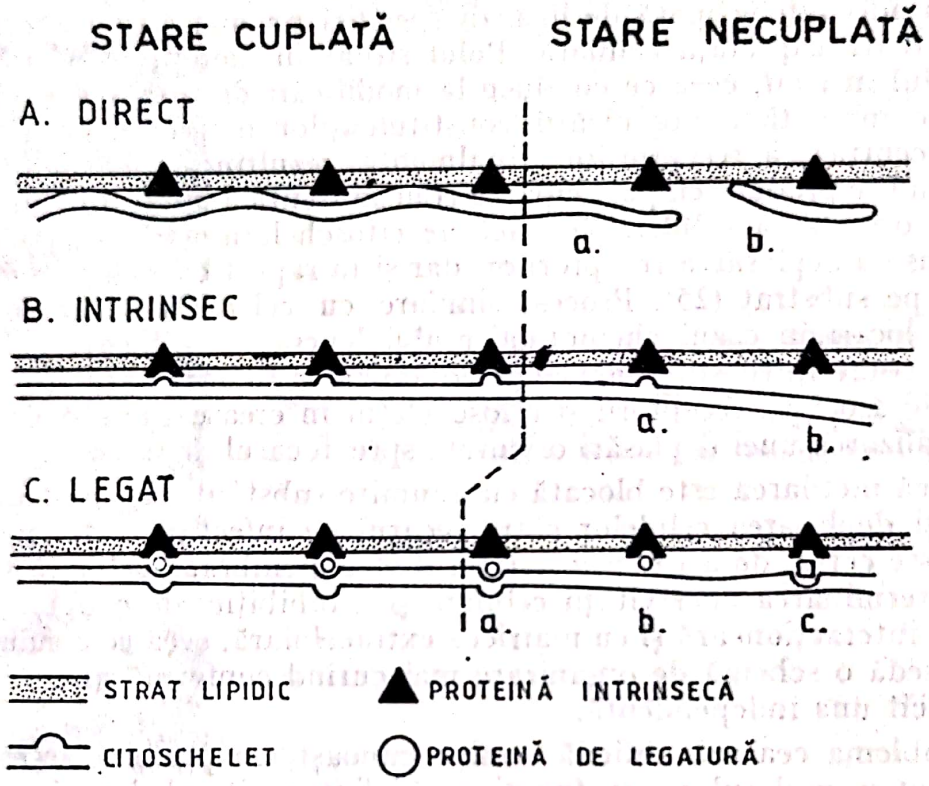


Fig. VI. 12 — Modele de cuplare a membranei cu citoscheletul: A) *direct:* aderare directă la stratul bilipidic, fără medierea unor proteine; B) *intrinsec:* citoscheletul este cuplat la dublul strat prin legare cu proteinele intrinseci; C) *legat:* cuplarea este realizată prin proteine de legătură specifice (După F. H. Kirkpatrick, 1979) (49).

electronice se observă fibre subțiri care pleacă de la organite în direcția filamentelor proteice adiacente. Ribozomii sînt adesea asociați cu microfilamentele, iar la extracția cu detergenți neionici cea mai mare parte a sistemului de sinteză proteică subzistă cu citoscheletul. Chiar enzimele solubile, cum sînt cele implicate în glicoliză, par legate de filamentele de actină ale miofibrilelor și rețelei de actină a fibroblastelor, unde pot fi detectate prin imunofluorescență (5, 6).

4.5. Macromoleculele citosolice

Componentele citoscheletului interacționează cu unele *macromolecule citosolice*. Astfel, microtubulii joacă un rol în transportul macromoleculelor în interiorul unei celule și se presupune că în acest scop formează chiar canale în citoplasmă. De exemplu, în melanocit după diverși stimuli granulele de melanină sînt animate de o mișcare centrifugă și centripetă. S-au observat

Scanned with OKEN Scanner

granule deplasîndu-se între canalele create de microtubuli în matricea citoplasmatică (28).

Un exemplu clar asupra rolului citoscheletului în evenimentele intracelulare îl reprezintă transportul proteinelor în celula nervoasă (fig. 13). Dacă neuronii sînt marcați cu un aminoacid radioactiv aplicat la nivelul corpului celular, vor fi sintetizate proteine citoscheletice ale căror transport

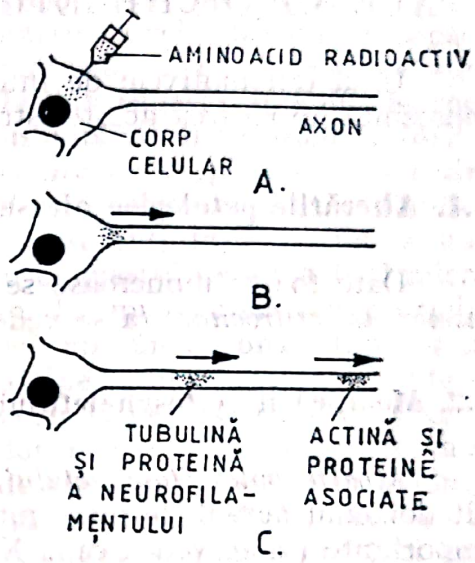


Fig. VI. 13 — Reprezentarea schematică a modului în care poate fi măsurat transportul lent al proteinelor de la nivelul axonului.

axonal va putea fi urmărit, deoarece ele au devenit radioactive prin încorporarea aminoacidului respectiv. Se constată astfel că proteinele sînt transportate de-a lungul axonului cu o viteză lentă, dar constantă, printr-un proces denumit transport axonal lent. Componentele principale identificate ca determinante ale acestui transport lent sînt: un compus foarte lent, alcătuit exclusiv din tubulină și proteinele neurofilamentelor și un compus puțin mai rapid, constituit din actină și o serie de proteine asociate. Este interesant faptul că printre proteinele ce se deplasează cu actina se găsesc și unele enzime, considerate solubile, ca enolaza și creatinchinaza. Datorită faptului că ele se deplasează sub forma unei benzi radioactive, timp de săptămîni sau luni, devine incertă probabilitatea difuziei libere în citoplasmă, așa cum s-a crezut pînă nu demult. În plus, deoarece au aceeași viteză de deplasare cu a actinei, se poate presupune că ele sînt asociate filamentelor de actină (5, 6).

4.6. Diviziunea celulară

Citoscheletul este implicat și în *diviziunea celulară*, modificîndu-se în timpul ciclului mitotic îndeosebi la nivelul microtubulilor, de unde provin forțele pentru mișcările mitotice (81).

Participarea citoscheletului la o serie de procese intracelulare este descrisă în alternative tot mai complete. Astfel, de exemplu, un mare număr de lucrări atestă implicarea proteinelor citoscheletice în secreția de insulină. Mai mult, această structură este modificată în unele forme de diabet (13, 17, 43, 100).

Scanned with OKEN Scanner

Toate constatările experimentale enumerate și altele asemănătoare modifică sensibil reprezentările asupra unor structuri și procese intracelulare în cadrul unor procese fiziologice și patologice.

5. PATOLOGIA MOLECULARĂ PRIN MODIFICĂRI ALE CITOSCHELETULUI

Unul din motivele de interes major ale cunoașterii citoscheletului îl reprezintă implicarea acestei structuri într-o diversitate de stări patologice.

5.1. Alterările patologice ale scheletului membranei eritrocitare

Date foarte numeroase se referă la *alterările patologice ale scheletului membranei eritrocitare* (a se vedea cap. VII).

5.2. Modificările citoscheletului la nivelul celulelor canceroase

Modificările citoscheletului la nivelul celulelor canceroase constituie un alt domeniu actual de mare interes, în care s-au acumulat o serie de date importante (a se vedea cap. XI).

5.3. Patologia motilității celulare

Patologia motilității celulare este consecința alterării citoscheletului. În esență, există două căi de structurare a „mașinării" responsabile de motilitatea celulară: a) prima constă din asocierea microfilamentelor de actină cu miozină; b) a doua este reprezentată de microtubuli (deci tubulină), asociați cu molecule de dineină. Prima alternativă stă la baza mișcării ameboidale de locomoție, ca și a fenomenelor de motilitate de la nivelul microvililor. A doua alternativă, sistemul microtubul-dineină determină mișcarea cililor și a flagelilor. Mișcările sînt activate de diferite substanțe. Deoarece microtubulii prezintă o ultrastructură rezistentă la presiuni s-a afirmat că ar fi adecvați mișcărilor de tip împingere, așa cum microfilamentele ar exercita mișcări de tragere. Dacă aceste ipoteze sînt adevărate, ar putea exista două tipuri de celule cu mișcări analoge celor două categorii de mușchi scheletici, flexori și extensori. Asemenea constatări de ansamblu rămîn la stadiul de speculații, în schimb, cunoașterea bazelor moleculare ale motilității celulare a condus la dezvoltarea explicării patologiei unor boli în care motilitatea este alterată.

O serie de cercetări au relevat modificări complexe ale *motilității leucocitare*. Prezentăm doar cîteva date de ansamblu legate de patologia citoscheletului leucocitar și începem cu *sindromul Chediak-Higashi*, deoarece se pare că este cea mai studiată afectare patologică a sistemului microtubular leucocitar. Sindromul afectează omul, dar au fost izolate și modele animale, cum ar fi o specie de șoareci bej și nurca aleutină (74). Sindromul este congenital și se caracterizează prin albinism parțial, infecții piogene recurente severe

Scanned with OKEN Scanner

și dezvoltarea unei pancitopenii. Diagnosticul se bazează pe examinarea leucocitelor eozinofile și neutrofile, care conțin granule intracitoplasmatice gigante (20, 30). Aceste granule rezultă ca urmare a unui defect de asamblare a tubulinei în microtubuli. Numărul de microtubuli din jurul centriolilor se reduce, iar motilitatea neutrofilelor este detectată modificată în toate testele de migrare (20, 65). Sindromul Chediak-Higashi nu trebuie confundat cu „sindromul leucocitelor leneșe" *(lazy-leukocyte syndrome)*, în care defectul primar pare să rezide în diminuarea abilității chemotactice a celulelor și nu a capacității migratorii a acestora (2). J.L. Gallin și colab. afirmă, că au descris o afecțiune, în care, spre deosebire de sindromul Chediak-Higashi, funcțiile leucocitare anormale sînt determinate de creșterea asamblării microtubulare (61).

Patologia provocată de *alterările moleculare și funcționale ale mișcării ciliare* se dovedește relativ amplă. În prealabil vom descrie succint caracterele acestui tip de mișcare, cel mai bine explicat în prezent, după contracția musculară. Cilii reprezintă apendice minuscule cu diametrul de circa 0,25 micrometri, a căror parte centrală conține o rețea de microtubuli. Ei proemină la suprafața a numeroase tipuri de celule, la om un număr considerabil de cili (10^9 pe cm^2 sau chiar mai mulți) fiind situați pe celulele epiteliale ce tapetează tractusul respirator. În acest caz ei servesc la deplasarea straturilor de mucus, ca și a particulelor de praf și a celulelor moarte, pînă în faringe, unde sînt înghițite și eliminate. Cilii antrenează, de asemenea, ovulele în oviduct.

Mecanismul motilității cililor se bazează pe microtubuli, ceea ce se reflectă clar pe plan ultrastructural. Mișcarea cililor este coordonată și unidirecțională. Flagelii simpli ai spermatozoidului și de la numeroase protozoare au o structură internă foarte asemănătoare cu a cililor mari, dar sînt

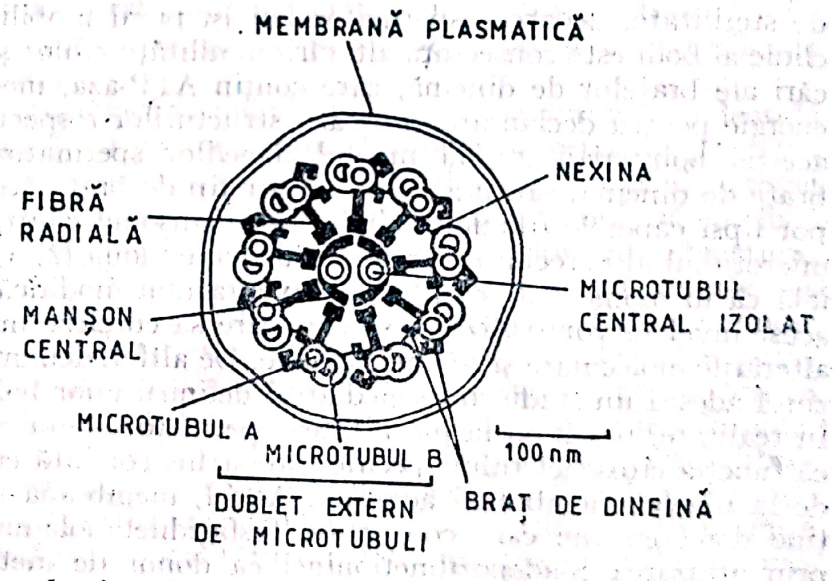


Fig. VI. 14— Reprezentarea schematică a unui cil în secțiune transversală (După B. Alberts și colab., 1986) (5).

mult mai lungi și în locul mișcării „de bici" propagă de obicei unde sinusoidale. Baza moleculară a mișcării este, însă, aproape identică. Mișcarea ciliară se produce prin flexia părții centrale a cilului, sau axonema, compusă din microtubuli și proteine asociate. Axonema comportă un fascicul de 9 dubleți de microtubuli dispuși în inel în jurul unei perechi de microtubuli separați. Acest aranjament de „9 + 2" este caracteristic pentru aproape toate formele de flageli și cili ai eucarioteler (fig. 14).

Scanned with OKEN Scanner

La nivelul microtubulilor din axonemă se asociază numeroase structuri proteice, a căror interacțiune alimentează „motorul" ciliar și îl determină să angajeze mișcări ondulatorii. Cele mai importante sînt o serie de brațe grupate pe perechi și spațiate în lungul microtubulului la intervale regulate de 24 nm. Brațele sînt alcătuite dintr-o proteină denumită dineină, cu rol esențial în mișcarea cililor. La intervale mult mai spațiate, o altă proteină — nexina — formează punți între dubleții adiacenți. O fibră radială pleacă de la fiecare dublet și se termină într-o zonă globulară, în apropierea manșonului central. Acesta este compus din brațe proteice efilate care pornesc din perechea centrală a microtubulilor. Manșonul ar permite părții centrale să intervină în reglarea mișcărilor axonemei.

Cilii și flagelii se termină în interiorul celulei prin corpusculul bazal, compus din microtubulii paraleli care formează un scurt cilindru, posedînd același diametru exterior și aceeași simetrie, de ordinul 9, ca axonema.

Mișcarea axonemei este dată de un mecanism de glisare a microtubulilor, dineina fiind responsabilă de acest proces, fapt demonstrat grație descoperirii unei activități ATP-azice a dineinei, care, deși este redusă, crește prin adiția de microtubuli purificați. Fiecare braț de dineină dezvoltă aproape aceeași forță ca o moleculă de miozină în mușchi. Această forță acționează în deplasarea microtubulului adiacent, pentru ca el să intre în contact cu capătul cilului (5, 6, 11).

Unul din cele mai cunoscute exemple de patologie indusă de alterările cililor este *sindromul lui Kartagener*, tulburare ereditară și familială caracterizată prin triada: bronșiectazie bilaterală, inversiune viscerală și polipoză nazală sau sinuzită maxilară (etmoido-antrită). În plus, bolnavii sînt afectați de sterilitate, deoarece spermatozoizii își pierd mobilitatea. Întregul tablou clinic al bolii este consecința alterării motilității cililor și flagelilor prin modificări ale brațelor de dineină, care conțin ATP-aza, mecanismul generator de energie pentru declanșarea mișcării structurilor respective. Funcție de forma acestei boli ereditare, la nivelul flagelilor spermatozoizilor lipsesc ambele brațe de dineină, sau numai un singur tip de braț, extern ori intern. Alteori pot lipsi capetele fibrelor radiale, sau manșonul central, concomitent cu un microtubul al perechii centrale și chiar amîndouă (2, 3, 4, 11, 69). Fără îndoială că în momentul completării inventarului modificărilor moleculare de la acest nivel se vor realiza clasificări care să coreleze mai exact relația dintre alterările moleculare și semnele clinice. De altfel, denumirea de sindrom reprezintă adesea un stadiu intermediar al definirii unor boli bine individualizate. În realitate, revenind la motilitatea spermatozoidului, s-a demonstrat recent că funcția citoscheletului specific este strîns corelată cu o serie de modificări de la nivelul membranei acestuia. Astfel, membrana spermatozoidului conține două enzime care convertesc fosfatidiletanolamina în fosfatidilcolină, prin utilizarea S-adenozilmetioninei ca donor de metil. Este interesant că inhibarea conversiei cu S-adenozil-homocisteină produce o depresiune a motilității spermatozoidului. Devine clară în acest caz influența metilării fosfolipidelor asupra fluidității membranei (77). Rămîne de clarificat corelația dintre modificările biomembranei și cele ale citoscheletului. Studiile de microscopie electronică probează că afecțiunea se caracterizează prin modificări eterogene, determinate genetic și devine probabilă în viitor diferențierea mai multor entități patologice. Concomitent cu alterările spermatozoizilor,

Scanned with OKEN Scanner

la bolnavii cu sindrom Kartagener se regăsesc aceleași defecte moleculare la nivelul cililor de pe tractusul respirator. Ca urmare, cilii respiratori își pierd motilitatea, devenind incapabili să degajeze bronșiile și sinusurile de mucus. Rezultă astfel bronșite periodice și sinuzite cronice, care se pot complica prin suprainfectare. În prezent este posibilă înregistrarea „*clearence*-ului mucociliar" care înseamnă măsurarea eficienței lucrului depus de cili în eliberarea căilor respiratorii de mucus (2,91). Acest *clearance* este scăzut, sau adesea absent la bolnavi. Un alt test constă în inspecția motilității ciliare prin metode „*in situ*", sau prin examinarea la microscopul optic a unor biopsii reduse, recoltate din zone accesibile: mucoasa nazală, mucoasa bronșică, mucoasa din urechea medie, iar la femeie endometrul sau porțiunea superioară a uterului.

Un fapt surprinzător îl reprezintă constatarea că aproape jumătate din subiecții afectați de *sindromul cililor imobili* (denumire mai aproape de realitate decît cea de sindrom Kartagener) prezintă situs inversus. Frecvența extrem de mare a situsului inversus, în raport cu cea întîlnită la populația generală (în care cazurile de situs inversus sînt foarte rare), este explicată prin faptul că mișcarea unidirecțională a cililor în cursul dezvoltării embrionare a omului ar putea juca un rol determinant în asimetria normală stînga-dreapta a corpului.

Numărul persoanelor afectate de sindromul cililor imobili este evaluat la 1 din 20 000, la heterozigoți fiind mai mare, circa 1 din 30. Afectarea propriu-zisă este inegală, din cauza eterogenității modificărilor moleculare din cadrul sindromului. La unii bolnavi cilii sînt complet imobili, la alții ei prezintă mișcări limitate, de aici decurgînd probabil variabilitatea prezenței tulburărilor clinice. Evaluarea abilității migratorii a leucocitelor pe un număr limitat de cazuri (doar 8), a arătat o scădere a acestei capacități în 3 cazuri, cu reducerea numărului de microtubuli leucocitari în aria centriolilor (2).

Au fost detectate dischinezii ciliare primitive, rare, și în cazurile de sarcină extrauterină (91).

Pentru clinician cunoașterea mobilității ciliare se impune îndeosebi în bronșitele recidivante și în bronșiectazii. Analogia structurală, la nivel molecular, a flagelului spermatozoidului, a cililor celulari de la nivelul trompei Faloppio și a cililor celulelor mucoasei nazale sau bronșice trebuie să conducă mai întîi la excluderea unei tulburări a reproducerii. Studiul ultrastructural al cililor, chiar dacă rămîne examenul de referință, este extrem de laborios și costisitor. Determinarea *clearance*-ului mucociliar, deși accesibilă ca metodă, duce la numeroase artefacte și nu este întru totul specifică, deoarece poate semnifica deopotrivă anomalii ale cililor sau ale mucusului. De aceea, pentru uz clinic curent se propune prelevarea ceulului ciliate prin periere la nivelul mucoasei nazale sau dintr-o bronșie segmentară, în cursul unei fibroscopii. Apoi, celulele se transferă într-un mediu de cultură lichid și sînt examinate la un microscop cu platina încălzită (91). Observația directă permite examinarea celulelor ciliate și a vitalității lor. Coordonarea micărilor și cinetica cililor sînt analizate ulterior după înregistrarea magnetoscopică la viteză variabilă, realizată printr-o cameră video montată la obiectivul microscopului. Studiul frecvenței mișcărilor ciliare este posibil prin analiza modulației intensității luminoase într-un cîmp al imaginii de 12 micrometri, centrat pe cili, grație unui fotomultiplicator. Semnalul analogic obținut este stocat în memoria unui calculator. Ulterior, prin prelucrarea datelor se obține frecvența

Scanned with OKEN Scanner

fundamentală a cililor în cîmp. Frecvența medie a mișcărilor ciliare normale (din nas sau bronșii) este de 12,2 ± 1,8 Hertz (91). Există metode puse la punct și în scopul evaluării cinematicii spermatozoidului (fig. 15).

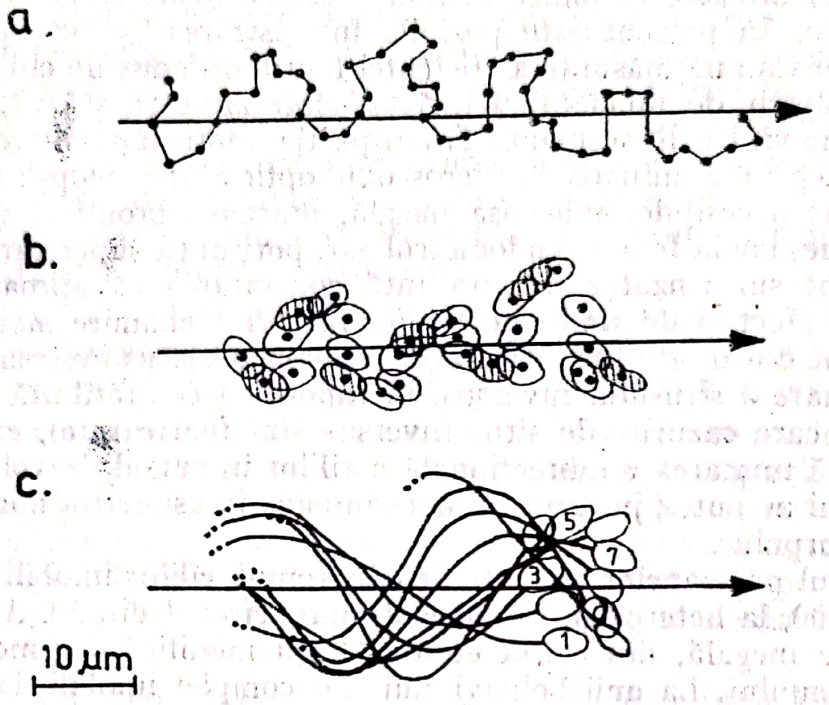


Fig. VI. 15 — Cinetica spermatozoidului uman: a) mișcările capului; o secundă de observație (50 de imagini pe secundă); b) pozițiile succesive ale capului în cursul mișcării; c) mișcarea flagelului în cursul unei perioade de mișcare a capului (După G. David și colab., 1981) (23).

★

La sfîrșitul acestor exemple certe de implicare a citoscheletului în patologie, mult reduse în raport cu amploarea reală a datelor noi (a se vedea cap. VII și XI), vom enumera cîteva alte stări patologice, în care este invocat rolul citoscheletului: au fost detectate alterări ale polipeptidelor citoscheletice în cadrul acțiunii toxice hepatice a alcoolului (27), modificări anormale ale microfilamentelor în zona polului biliar al hepatocitelor, ca urmare a unei colostaze intrahepatice (70), dezordini ale expresiei incorporării și reînnoirii desminei în benzile Z ale discurilor intercalate din miocardul bolnavilor de cardiomiopatie familială (91), modificări ale citoscheletului și alte elemente asociate în cancerul de prostată (93, 97), forme de diabet de tip II noninsulinodependent cu alterări la nivelul microfilamentelor de actină (13, 17, 43) etc.

Cercetarea citoscheletului reprezintă actualmente unul din subiectele de mare interes, concretizat printr-o concentrare particulară a forțelor de cercetare și de aceea datele sporesc continuu. Din datele obținute pînă în prezent, rezultă că o serie de procese fundamentale de la nivelul celulei, ca formarea și stabilizarea contactelor celulare, inclusiv a joncțiunilor, migrarea celulelor, mișcările locale ale membranelor plasmatice, redistribuția laterală a componentelor suprafeței celulare, endocitoza, depind de acțiunea integrată a plasmalemei și a citoscheletului. Cu certitudine, aceste date vor deschide noi căi în evoluția medicinii moleculare.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă

1. ALDESTEIN R. S., SCORDILIS S. P., TROTTER J. A. — Meth. Achiev. Exp. Pathol., 1979, 8, 1.
2. AFZELIUS B. A. — Pathology of Cell Motility, in Cell Biological Aspects of Disease (sub red. W. Th. Daems, E. H. Burger, B. A. Afzelius), Leiden University Press, 1981 pp. 145—150.
3. AFZELIUS B. A., ELIASSON R. — J. Ultrastruct. Res., 1979, 69, 43.
4. AFZELIUS B. A., EWETA I., PALMBLAD J., UDEN A. M., VENIZELOS N. — Acta Med. Scand., 1980, 208, 145.
5. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. — Biologie moléculaire de la cellule, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986, pp. 550—610.
6. BENGA GH. — Biologie celulară și moleculară, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1985, pp. 47—65.
7. BENNETT V., DAVIS J., FOWLER W. E. — Nature, 1982, 299, 126.
8. BIRCHMEIER W. — TIBS 1984, 9, 192.
9. BLOOM G. S., LUCA F. C., VALLEE R. B. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 5404.
10. BORISY G. G., TAYLOR E. W. — J. Cell Biol., 1967, 34, 525.
11. BOUCHARD P., COSSON M. P. — Ann. Endocr. (Paris), 1981, 42, 398.
12. BOURGUIGNON L. Y. W., BOURGUIGNON G. J. — Int. Rev. Cytol., 1984, 87, 195.
13. BOYS A. E. III, BOLTON W. E., BRINKLEY B. R. — J. Cell Biol. 1981, 92, 425.
14. BRAUN J., HOCHMAN P. S., UNANUE E. R. — J. Immunol., 1982, 128, 1198.
15. BRAUN J., UNANUE E. R., — Semin. Hematol., 1983, 20, 322.
16. CACERES A., PAYNE M. R., BINDER L. I., STEWARD O. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 1738.
17. CAHILL G. F. Jr., MC. DEVITT H. O. — New Engl. J. Med., 1981, 24, 1454.
18. CAIN H. — Path. Res. Pract., 1982, 175, 119.
19. CAMMER P., AFZELIUS B. A., ELIASSON R., MOOBERG B. — Int. J. Androl., 1979, 2, 211.
20. CLAWSON C. C., WHITE J. G., REPINE J. E. — Amer. J. Pathol., 1978, 92, 745.
21. COOPER J. A., HUNTER T. — Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1983, 107, 125.
22. CROSSIN K. L., CARNEY D. H. — Cell, 1981, 27, 341.
23. DAVID G., SERRES C., ESCALIER D. — Ann. Endocr. (Paris), 1981, 42, 391.
24. DE BRABANDOR M. J. — La Recherche, 1983, 14, 810.
25. DE CECCATY M. P. — Communications et interactions cellulaires, P.U.F., Paris, 1983, pp. 45—52.
26. DEDMAN J. B., BRINKLEY B. R., MEANS A. R. — Adv. Caclic Nucleotide Res., 1979, 11, 131.
27. DENK H., FRANKE W. W., DRAGOSICS B., ZEIHER I. — Hepatology, 1981, 1, 9.
28. DE ROBERTIS E. D. P., DE ROBERTIS E. M. F. Jr. — Biologie cellulaire et moléculaire, Les Presses de l'Université Laval, Quebec, Maloine S. A., Paris, 1983.
29. FECKHEIMER M., CEBRA J. J. — J. Cell Biol., 1982, 93, 261.
30. GABBIANI G., KAPANCI Y., BARRAZONE PH., FRANKE W. W. — Amer. J. Path., 1981, 104, 206.
31. GALLIN J. L., MALECH H. L., WRIGHT D. G., WHISNANT J., KIRKPATRICK C. H. — Blood, 1978, 51, 919.
32. GEIGER B. — Biochim. Biophys. Acta, 1983, 737, 305.
33. GEIGER B. — TIBS, 1985, 10, 456.
34. GEIGER B., SINGER S. J. — Cell, 1979, 16, 213.
35. GEORGE J. N., LYONS R. M., MORGAN K. K. — J. Clin. Invest., 1980, 66, 1.
36. GOODMAN S. R., CASORIA L. A., COLEMAN D. B., ZAGON I. S. — Science, 1984, 224, 1433.
37. GOODMAN S. R., ZAGON I. S. — Amer. J. Physiol., 1986, 250, C. 347.
38. GOZES I., LITTAUER U. Z. — Scand. J. Immunol., 1982, 15, Suppl. 9, 299.
39. GREBE R., SCHIMD-SCHÖNBEIN H. — Biorheology, 1985, 22, 455.
40. GROSCHEL-STEWART U. — Int. Rev. Cytol., 1980, 65, 193.
41. HAEST C. W. M. — Biochim. Biophys. Acta, 1982, 694, 331.

Scanned with OKEN Scanner

91. SOUQUET P. J., MASSONNET B., ROLLET J., BERLAND M., LETANCHE G., BERNARD J, P., TOURAINE R. — Rev. Mal. Resp., 1986, 3, 157.
92. STEINER M. — Nature, 1978, 272, 394.
93. STOECKEL M.-E., OSBORN M., PORTE A., SACREZ A., BATZENSCHALGER A., WEBER K. — Virchow. Arch. A Path. Anat., 1981, 393, 53.
94. SULLIVAN K. F., WILSON L. — J. Neurochem., 1984, 42, 1363.
95. TENG M. H., BARTHOLOMEW J. C., BISSELL M. J. — Nature, 1977, 268, 739.
96. TOH B. H., HARD G. C. — Nature, 1981, 269, 695.
97. TRUMP B. F., HAATFIELD B. M., PHELPS P. C. — In: Prostatic Cell: Structure and Function, Alan R. Liss Inc., New York, 1981, pp. 25—53.
98. WEATHERBEE J. A. — Int. Rev. Cytol., 1981, Suppl. 12, 113.
99. WEBER K., OSBORN M. — Pour la Science, 1985, 98, 80.
100. WEIHING R. R. — Meth. Achiev. Exp. Pathol., 1979, 8, 42.
101. WESTERMARK B., PORTER K. R. — J. Cell Bioll., 1982, 94, 42.
102. WOLOSEWICK J. J., PORTER K. R. — J. Cell Biol., 1979, 82, 114.
103. YAHARA I., KAKIMOTO-SAMESHINA F. — Cell, 1978, 15, 251.
104. ZOR U. — Endocr. Rev., 1983, 4, 1.

Scanned with OKEN Scanner

VII. Membrana eritrocitară—aspecte normale și patologice

„Sînt sigur că și în viitor, ca și în trecut, globulele roșii vor continua să joace un dublu rol: pe de o parte ca obiect de studiu prin ele însele, datorită importanței lor în medicină și, pe de altă parte, deoarece reprezintă un model minunat în biologia celulară".

S. M. RAPAPORT (1983)

De mai bine de un secol, eritrocitele reprezintă un model de studiu, care a permis observarea pentru întîia oară a unor fenomene și structuri ce au depășit larg interesul direct în cunoașterea acestei celule specializate, considerată uneori, cu totul incorect, drept „un sac cu hemoglobină" sau „o celulă în agonie".

Faptul că eritrocitul este o celulă specializată comparabilă din punct de vedere al complexității cu oricare altă celulă din organism este probat prin identificarea și izolarea la nivelul său a peste 140 enzime (256, 323). Cunoașterea structurii moleculare și a funcțiilor eritrocitare permite, de aceea, înțelegerea unor procese care depășesc larg aria de interes aparent restrictiv prin destinul fiziologic al acestei celule. Afirmația este probată de faptul că o serie de momente fundamentale din evoluția biologiei moleculare și a medicinii ultimilor decenii au ca punct de pornire hematia. Dintre acestea amintim doar două: cunoașterea structurii spațiale a hemoglobinei, care a modificat radical modul de înțelegere a organizării și funcției proteinelor, iar, în mod particular, pentru evoluția medicinii contemporane, conturarea conceptului de *boală moleculară*. Prin descrierea la nivel molecular a cauzelor siclemiei s-a demonstrat posibilitatea detectării cauzelor bolilor la nivelul cel mai subtil de organizare a materiei.

Eritrocitul s-a consacrat, de asemenea, ca modelul experimental cel mai utilizat în studiul biomembranelor. De aceea, membrana plasmatică a globulelor roșii umane este mai bine cunoscută decît oricare altă biomembrană a eucariotelor. Această preferință pentru cercetarea membranei eritrocitare se datorează unor rațiuni de ordin experimental: 1) globulele roșii sînt disponibile în cantitate mare și relativ puțin contaminate de alte tipuri celulare; 2) la nivelul eritrocitului există doar membrana plasmatică și, deci, nu se pune problema dificilă de separare a acesteia de membranele intracelulare; 3) membranele hematiilor sau stroma acestora pot fi separate de singura proteină majoră nemembranară, hemoglobina, prin introducerea în soluție salină hipotonă și liză consecutivă; 4) se obțin astfel „fantomele" eritrocitare *(ghosts)*, care permit manipulări diverse: cînd fantomele sînt deschise se pot experimenta substanțe cu interacțiuni moleculare la nivelul amaelor fețe,

Scanned with OKEN Scanner

sau, dimpotrivă, prin închiderea fantomelor se pot studia substanțe cu efect exclusiv la nivelul feței externe a membranei. În fantomele reînchise („resigilate") se pot introduce soluții cu conținut adecvat de ioni și de ATP, membranele izolate de hemoglobină prezentînd proprietăți de transport similare cu hematia normală. Din stroma eritrocitară se obțin vezicule cu păstrarea dispoziției normale a membranei, sau vezicule inversate, cu fața internă a membranei situată la exterior (fig. 1). Toate aceste posibilități, la care se adaugă rezistența în condiții controlate, *in vitro*, au transformat membrana eritrocitară într-un model de o extremă popularitate cu atît mai mult cu cît, ea se aseamănă cu celelalte tipuri de biomembrane, atît în planul organizării moleculare, cît și pe plan funcțional.

Funcția de bază a plasmalemei eritrocitare este concentrată în rolul primordial al globulului roșu: menținerea hemoglobinei într-o stare capabilă să efectueze transferul oxigenului și dioxidului de carbon în circuitul plămîni-țesuturi. Pentru prezervarea unui mediu intracelular adecvat membrana prezintă o serie de caractere particulare de permeabilitate. Astfel, la nivelul său se produce un flux intracelular, continuu de glucoză și un eflux al produșilor de degradare metabolică, îndeosebi piruvat și lactat. În același timp membrana limitează ieșirea glutationului, ATP și nucleotidelor, fiind în mod necesar impermeabilă pentru o serie de metaboliți și ioni, asigurînd un pasaj selectiv pentru o serie de alte substanțe (1).

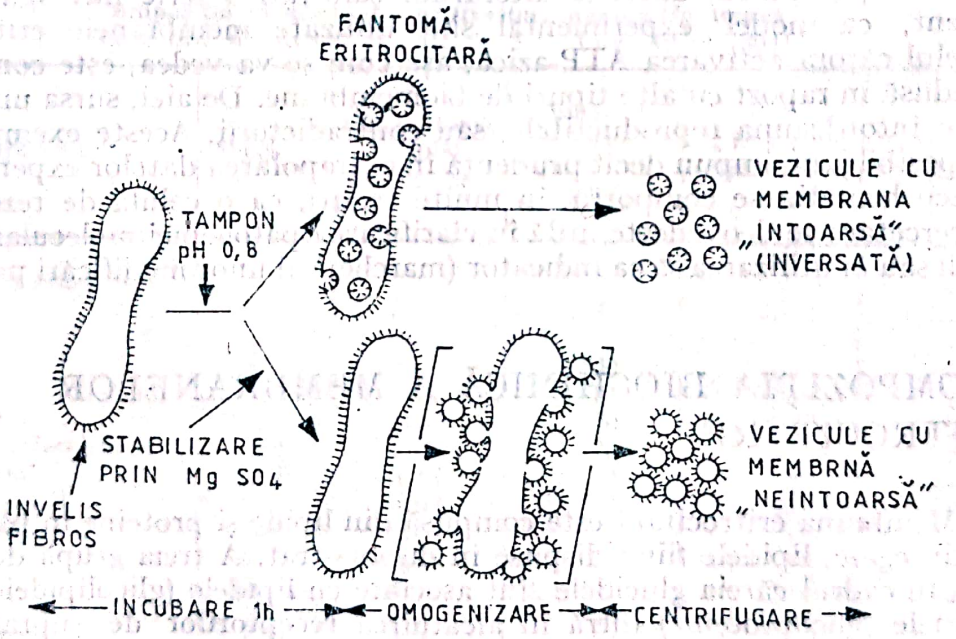


Fig. VIII. 1 — Prepararea de vezicul pornind de la fantomele de globule roșii de om (După T. L. Steck, 1974 și A. Berkaloff și colab., 1977) (29, 308).

Deși ultraspecializată, hematia conține, îndeosebi la nivelul membranei, o serie de enzime, proteine, hidrocarbonate, lipide, care pe lîngă asigurarea funcțiilor specifice, probează, participarea sa activă într-o serie de procese metabolice semnificative. În comparație cu alte tipuri celulare, capacitățile de sinteză ale eritrocitului sînt restrînse, din cauza lipsei nucleului și a orga-

nitelor intracelulare. Pentru compensarea acestor deficiențe, proteinele membranei eritrocitare prezintă o rată de schimb redusă, iar celula poate achiziționa fosfolipide, acizi grași și colesterol din plasma circulantă (78). Deoarece legarea, transportul și distribuția oxigenului sînt procese pasive și nu necesită un consum direct de energie, aceasta semnifică faptul că energia metabolică generată este utilizată pentru prezervarea funcțională a hematiei. Astfel, energia metabolică este esențială în: 1) menținerea nivelului crescut de K^+ și concentrației scăzute de Na^+ și Ca^{2+} în celulă; 2) starea redusă și funcțională a hemoglobinei; 3) nivelul crescut al glutationului celular în forma redusă; 4) diacilarea fosfolipidelor; 5) forma discoidală, deformabilă a hematiei.

În ciuda evidentei consacrări a membranei hematiei, ca model al membranelor biologice în general, este necesar să se ia în considerare cu ocazia interpretării datelor fiecărui experiment, limitările considerabile impuse de specializarea eritrocitului. Vom oferi doar două exemple. Primul se referă la fluiditatea membranei eritrocitare, care în acord cu criteriile ce obiectivează această proprietate, este mai redusă decît a majorității celorlalte membrane celulare. Totuși, eritrocitul este capabil să suporte într-o măsură mult mai mare decît alte celule, deformări și presiuni în cadrul circulației sanguine, în primul rînd ca urmare a integrării deosebit de strînse a citoscheletului cu membrana și, într-o măsură mai mică, datorită viscozității reduse a sîngelui. Al doilea exemplu: activitatea ATP-azei (Na^+, K^+) dobîndește tot mai mult o semnificație clinică, datorită alterărilor sale într-o serie întreagă de boli. Frecvent, ca model experimental sînt utilizate membranele eritrocitare, la nivelul cărora activarea ATP-azică, așa cum se va vedea, este considerabil mai redusă în raport cu alte tipuri de biomembrane. De aici, sursa unor rezultate nu întotdeauna reproductibile, sau contradictorii. Aceste exemple, ca și altele posibile, nu impun decît prudență în extrapolarea datelor experimentale deoarece hematia se comportă, în multe cazuri, ca o celulă de rezonanță a cărei cercetare se deovedește utilă în clarificarea patogeniei moleculare a multor boli sau în utilizarea sa ca indicator (marcher) al unor modificări patologice.

1. COMPOZIȚIA BIOCHIMICĂ A MEMBRANELOR EITROCITARE

Membrana eritrocitară este compusă din lipide și proteine în părți aproximativ egale, lipidele fiind dispuse în dublu strat. A treia grupă de componente, în cadrul căreia glucidele sînt asociate cu lipidele (glicolipidele) sau cu proteinele (glicoproteine) intră în alcătuirea receptorilor de suprafață și a antigenelor de grup sanguin.

O serie de componenți moleculari fac parte integral din compoziția membranei, dimpotrivă alții apar atît în membrană cît și în fluidul extracelular. De aceea, devine posibil ca la nivelul membranelor izolate (fantomelor) să nu se afle asociate unele molecule de suprafață.

Există mai multe tehnici de obținere a fantomelor eritrocitare, dar riscul variabilității datelor este redus, deoarece se utilizează frecvent tehnica lui J.T. Dodge și colab. (91). După liza experimentală rămîne corpul discoidal eritrocitar delimitat de membrană, hemoglobina și, probabil, alte compo-

Scanned with OKEN Scanner

nente fiind îndepărtate. În microscopia electronică prin transmisie clasică imaginile membranei apar identice, trilamelare, atît în cazul hematiilor intacte cît și al fantomelor. Totuși, există diferențe semnificative funcționale și structurale între cele două alternative de studiu al membranei eritrocitare (20, 61, 310). Utilizarea termenilor „membrană" și „fantomă" ca sinonime poate conduce, deci, la erori. S-a propus termenul de membrană pentru suprafața globulelor roșii intacte, iar denumirea de fantomă pentru membrana obținută după liza osmotică a hematiilor (343).

1.1. Lipidele membranei eritrocitare

La hematia matură lipidele dispuse în dublu strat sînt cuprinse constant în membrană și nu există lipide asociate la fracțiunile a căror prezență variază funcție de metodele de preparare a membranelor (319, 332). Deși tipurile de molecule lipidice componente sînt variate, fosfolipidele și colesterolul reprezintă peste 95% din total (319). Rația molară colesterol/fosfolipide este de circa 0,82 spre deosebire de membranele mitocondrială, a bastonașelor retiniene și bacteriene (86, 141). Interacțiunea acestor două componente este determinantă în stabilitatea și funcționalitatea stratului bilipidic.

TABEL I

Compoziția membranelor eritrocitare umane (fantome)
(Date din literatură, reunite de S.E. Lux, 1979) (201)

Component	Masă %	GM/fantomă ($\times 10^{13}$) (în daltoni)	Număr de molecule/ /fantomă ($\times 10^{6}$)	% în stratul lipidic extern	% în stratul lipidic intern
1. *Proteine + glicoproteine*	55	5,7	3,7	—	—
2. *Lipide:*					
Fosfolipide	28	3	250	—	—
Sfingomielină	7,1	0,76	65	80	20
Fosfatidilcolină	7,9	0,85	70	75	25
Fosfatidiletanolamină	7,8	0,84	70	20	80
Fosfatidilserină	3,8	0,41	35	0	100
Fosfatidilinozitoli	0,4	0,04	3	20	80
Acid fosfatidic	0,4	0,04	3	?	?
Alte lipide	0,6	0,06	5	?	?
Colesterol	13	1,3	195	50	50
Glicolipide	3	0,3	10	100	0
Acizi grași liberi	1	0,1	20	?	?
	100	10,4	480		

Datele analitice asupra compoziției lipidice a membranei obținute pe eritrocite intacte și fantome sînt comparabile. Frecvent, valorile obținute au fost exprimate pe ml depozit eritrocitar separat după centrifugare. Volumul celulelor este însă, strîns dependent de pH și de compoziția ionică a soluțiilor de spălare utilizate. De aceea devine mai semnificativă exprimarea concentrației lipidelor pe număr de celule, de obicei 10^{10}, echivalentul aproximativ a 1 ml de celule spălate. Concentrația totală de lipide în 10^{10} celule

Scanned with OKEN Scanner

TABEL II

Lipidele din membrana eritrocitară (masele comparate) (După C. S. Sweeldy și G. Dawsan, 1969) (319)

Tipul de lipid	μMol × 10^{-10}/cel.
Colesterol	3,2
Acizi grași liberi, gliceride, esteri de sterol (contaminare prin lipidele plasmei ?)	0,1
Fosfatidilcolină	1,2
Fosfatidilserină	0,6
Fosfatidiletanolamină	1,1
Fosfatidilinozitol	0,03
Sfingomielină	1,0
Lizolecitină	0,04
Acid fosfatidic	0,04
Glicosfingolipide (îndeosebi globozide)	0,2

este de 5 mg, din care 60% reprezintă fosfolipide, 30% lipide neutre și 10% glicolipide.

1.1.1. *Fosfolipidele*

Proporția diferitelor subgrupe de fosfolipide eritrocitare a fost menționată în capitolul III. Fosfolipidele din stratul extern adoptă preferențial o structură lamelară. Dimpotrivă, fosfatidiletanolamina și fosfatidilserina de la nivelul foiței interne au tendință să se organizeze în structuri hexagonale poroase (254). Structura în lamelă este stabilizată de colesterol și proteinele subiacente. Modificările interacțiunilor stabilizatoare pot deci să afecteze considerabil organizarea și rolul lipidelor (54).

Cu marcheri de rezonanță electronică de spin s-a demonstrat că moleculele lipidice prezintă mișcări de difuzie laterală rapidă (10^7 ori pe secundă) în interiorul unui monostrat, ca și mișcări rapide în jurul propriului ax. Mișcările de migrare dintr-un strat lipidic în altul *(flip-flop)* sînt mai lente (~ 7 zile).

Membrana eritrocitară este singura plasmalemă la nivelul căreia dispunerea asimetrică a lipidelor pe cele două fețe, internă și externă, a fost demonstrată într-o manieră convingătoare (47). Ideea că fosfolipidele sînt dispuse asimetric își are originea în observația că fosfatidiletanolamina reacționează mai ușor cu formilmetioninsulfon-metil-fostatul (FMMP) pe fantomele eritrocitare față de eritrocitele intacte (fig. 2).

Analiza cantitativă a distribuției fosfolipidelor, bazată pe acțiunea fosfolipazelor a demonstrat că la nivelul suprafeței externe a membranei eritrocitare de om se află circa 75% din totalul fosfatidilcolinei, 82% din întreaga cantitate de sfingomielină și 20% din totalul fosfatidiletanolaminei. La nivelul fetei interne este dispusă integral fosfatidilserina, cea mai mare parte a fosfatidietanolaminei și o fracțiune minoră a fosfatidilcolinei (235). În afara fosfolipidelor enumerate, majore cantitativ, dintre fosfolipidele minore (4—6% din total) menționăm acizii fosfatidici și lizofosfatidilcolinele sau lizolecitinele,

Scanned with OKEN Scanner

formate din fosfatidilcoline prin îndepărtarea unui acid gras și caracterizate prin proprietăți hemolitice puternice.

Originea asimetriei lipidice este încă insuficient explicată. S-a sugerat interacțiunea specifică dintre lipide și proteine ca mecanism operant. Spectrina pare, în acest sens, implicată, deoarece alterarea sa oxidativă crește

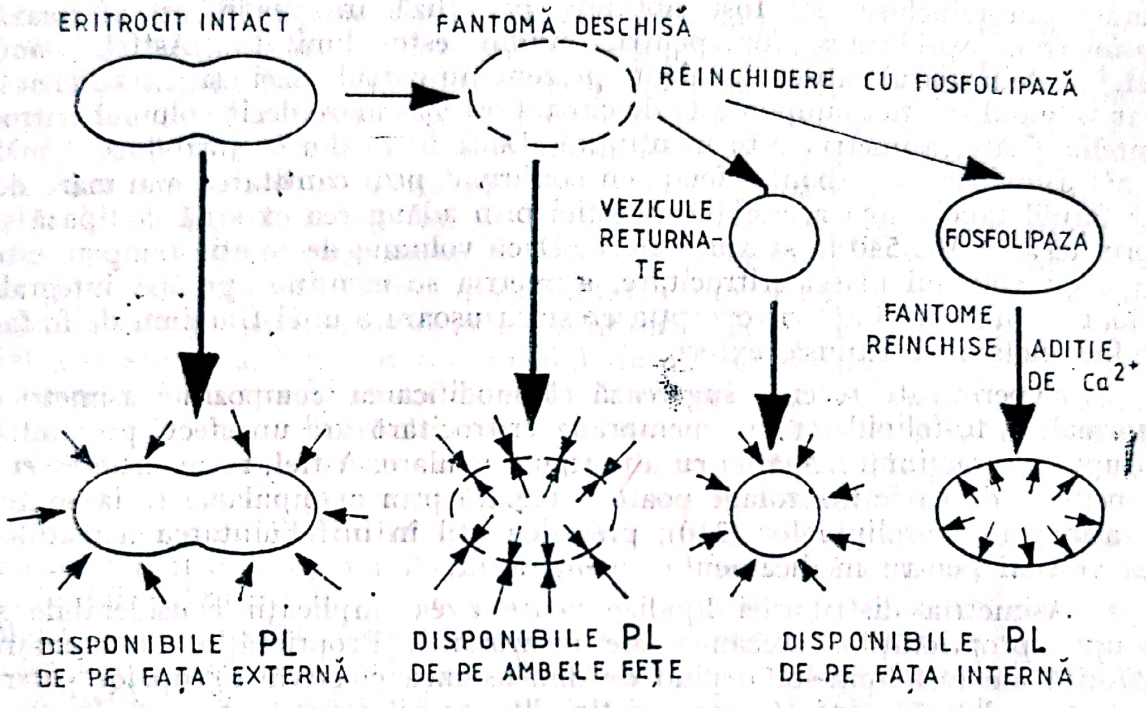


Fig. VII. 2— Schema de principiu a experimentărilor prin intermediul cărora se detectează orientarea fosfolipidelor (PL) la nivelul membranei eritrocitare.

conținutul fosfatidiletanolaminei și fosfatidilserinei în stratul extern lipidic (139). Un mecanism posibil în cursul dezvoltării, dar neindentificat la hematia matură, este conversia fosfatidiletanolaminei în fosfatidilcolină prin acțiunea metiltransferazei (333). Această distribuție a grupurilor polare între cele două straturi lipidice poate crea două tipuri de suprafețe ionice. Astfel, stratul extern lipidic este mai zwitterionic, în timp ce foița internă lipidică are un pronunțat caracter anionic. Ionii de semn contrar, cum sînt Ca^{+2} și Mg^{+2}, pot avea un rol important în neutralizarea forțelor repulsive și în legarea altor molecule, ca proteinele, cu capetele anionice ale fosfolipidelor de pe fața internă a membranei. În contrast, pe fața externă a membranei se leagă puține proteine (323). Asimetria cu respectarea grupărilor capetelor lipidice creează un tip secund de asimetrie, conform căruia lanțurile de acizi grași ale fosfolipidelor, care predomină în exterior, sînt mai saturate decît ale pelor care predomină în interior (fig. 31). Deoarece acizii grași saturați se „împachetează", se strîng mai eficient decît cei nesaturați, lipidele monostratului extern sînt repartizate mai compact decît cele de la nivelul stratului intern al membranei (37, 332). Diferența în spațierea lipidelor eritrocitare a fost pusă în evidență cu o substanță fluorescentă naturală, merocianina 540 (MC 540) sensibilă la dispunerea compactă a lipidelor. Aplicată în exteriorul eritrocitelor normale ea nu se leagă de membrană. Dimpotrivă, aplicată pe eritrocite cu asimetria lipidică pierdută, substanța servește la detectarea reducerii

„împachetării" lipidice de la nivelul foiței externe, prin introducerea de lanțuri de acizi grași nesaturați din stratul intern. În acest caz MC 540 este capabilă să se lege de membrană în zona lipidică mai puțin compactă (2, 350). Deoarece în cazul cînd hematiile suferă o liză hipotonică și sînt reînchise, asimetria nu este în mod necesar menținută, se pun serioase probleme metodologice (67). Dacă fantomele eritrocitare, utilizate ca atare sau reînchise, au fost obținute prin liză în medii ce afectează asimetria, validitatea lor pentru studiu este limitată. Astfel, cînd Mg^{2+} este singurul cation bivalent prezent în cursul lizei și „resigilării", iar volumul soluției tampon este de circa 4 ori mai mare decît volumul eritrocitelor lizate, asimetria este menținută. Dacă în mediu se introduce 1 mM Ca^{2+} asimetria este abolită, fenomen confirmat prin cantitatea mai mare de fosfatidiletanolamină accesibilă digestiei prin adăugarea externă de lipază și prin legarea MC 540 la stratul extern. Dacă volumul de soluție tampon este egal cu volumul masei eritrocitare, asimetria se menține aproape integral, chiar în prezența Ca^{2+} cu excepția creșterii ușoare a unei fracțiuni de fosfatidiletanolamină expusă extern.

Experimente recente sugerează că modificarea compoziției asimetrice normale a fosfolipidelor din membrana eritrocitară are un efect pronunțat asupra interacțiunii hematiei cu alte tipuri celulare. Astfel, recunoașterea eritrocitelor de către macrofage poate fi reglată prin manipularea în laborator a asimetriei fosfolipidelor (210), procedeu util în întrebuințarea hematiilor ca vehicul pentru medicamente, în organism.

Asimetria distribuției lipidice poate avea implicații considerabile și asupra proprietăților mecanice ale membranei. Proprietățile de aranjare diferită ale fosfolipidelor depind de dimensiunea efectivă a grupelor polare hidratate, dar ele conferă caracteristici diferite celor două straturi. În plus,

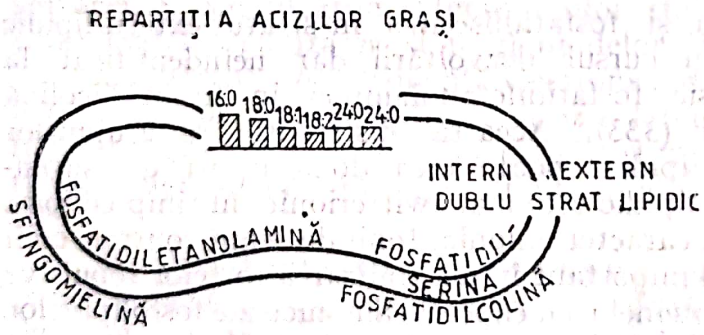


Fig. VII. 3 — Reprezentare schematică a asimetriei lipidelor de la nivelul membranei eritrocitare, cu menționarea repartiției acizilor grași.

datorită excesului de sarcini negative asociat cu fosfatidilserina pe fața internă, cele două straturi pot răspunde diferit la modificări ale mediului. Astfel, prin distribuția asimetrică a lipidelor se poate determina curbatura spontană a membranei (144). Totodată, distribuția normală a lipidelor este o condiție pentru inserția corectă, funcțională, a proteinelor în dublul strat lipidic (161).

Pe lîngă distribuția asimetrică în cele două straturi lipidice, s-au obținut tot mai multe probe asupra distribuției neuniforme a lipidelor în fiecare strat. Astfel, studii chimice de legare încrucișată au indicat aglomerări de fosfatidiletanolamină și fosfatidilserină în proximitatea spectrinei (206).

Scanned with OKEN Scanner

1.1.2. *Lipidele neutre*

Colesterolul liber este componentul major al lipidelor neutre în membranele eritrocitare. Celelalte lipide neutre-gliceride, acizi grași liberi, esteri de colesterol — reprezintă circa 20% din fracțiunea totală lipidică neutră (332). În contrast cu fosfolipidele, informațiile asupra distribuției colesterolului în stratul bilipidic sînt limitate, în parte datorită naturii sale nonreactive (este posibilă doar acilarea enzimatică a grupului 3-β-hidroxil). Colesterolul esterificat are o afinitate redusă sau nulă pentru fosfolipide, fiind încorporat dificil în membrana eritrocitară. Cu toate acestea există încercări de determinare a localizării colesterolului prin marcare cu osmiu, material electronodens vizibil în microscopie electronică. După examinarea membranelor eritrocitare de la șobolan s-a observat o dispersie a osmat-esterilor de colesterol sub forma unor aglomerări distribuite în toată grosimea membranei (148). Nu este exclusă însă eventualitatea unor artefacte produse în timpul fixării. Mai convingătorare este vizualizarea distribuției colesterolului tritiat (colesterol-7α-^{3}H) prin intermediul autohistoradiografiei. S-a observat o concentrare a colesterolului în periferia discocitului eritrocitar, dar există și zone de localizare la nivelul suprafeței convexe (224). Ca și în alte cazuri similare de localizare precisă a moleculelor la nivelul membranelor, criodecapajul s-a dovedit cea mai bună metodă de relevare a asimetriei. În urma criofracturii s-a produs clivajul dublului strat lipidic, devenind astfel posibilă analiza repartiției colesterolului pe cele două jumătăți obținute (104). În ciuda dificultăților tehnice, această metodă a confirmat prezența colesterolului în ambele jumătăți ale membranei, dar proporția asocierii cu jumătatea externă este mai mare. Colesterolul se leagă puternic cu sfingomielina și la fosfolipidele neutre cu lanțuri de acizi grași nesaturați. Or, ținînd seama de distribuția asimetrică a sfingomielinei majoritară la suprafața externă a membranei, se poate afirma că repartiția colesterolului, se produce prin interacțiunea cu acest fosfolipid.

Distribuția colesterolului poate depinde de variațiile tensiunii interfaciale în diferite zone ale membranei. S-a propus o explicare a formei eritrocitului pe baza acelorași variații, cu implicarea colesterolului. Ipoteza a fost respinsă după clarificarea rolului determinant al citoscheletului în menținerea formei specifice a hematiei. Colesterolul are, însă, un efect plasticizant probat prin tehnici fizice variate. Astfel, încărcarea cu colesterol a membranei produce rigidizarea acesteia, prin alterarea interacțiunilor lipide-lipide și proteine-lipide. Hematiile prezintă o reducere a fragilității osmotice, o scădere a filtrabilității (deci a deformabilității) și o descreștere a fluidității membranei în funcție de sporirea conținutului în colesterol (65, 82, 271). Intercalarea moleculelor de colesterol între lanțurile de acizi grași servește la reglarea fluidității membranei (a se vedea și cap. III). Rolul colesterolului este dependent de temperatură, sub temperatura de tranziție acesta exercitînd un efect disruptiv. Cercetări variate au arătat că o depleție eritrocitară de colesterol de peste 55% conduce la creșterea fragilității osmotice și a permeabilității pentru glicerol, acetat și propionat (84).

1.1.3. *Glicolipidele*

Frecvent conținutul în glicolipide, denumite mai specific glicosfingolipide, este estimat prin scăderea din fracțiunea lipidelor a sumei fosfolipidelor

Scanned with OKEN Scanner

și lipidelor neutre și reprezintă între 5 și 10% din lipidele totale Studiul lor a fost stimulat de implicarea în determinismul grupelor sanguine (319, 332, 338). Majoritatea glicolipidelor asociate membranei eritrocitare sînt globozide, conținînd între 1 și 4 reziduuri de hexoză. Totuși, au fost puse în evidență și cantități foarte mici de hematozide (114, 177).

Localizarea și distribuția glicosfingolipidelor a fost posibilă, în mare măsură, datorită abilității lor de a reacționa cu antiseruri specifice, sau cu enzime ca galactoz-oxidaza sau neuraminidaza. Ele determină o serie de proprietăți antigenice, ceea ce a condus la concluzia că sînt expuse la nivelul suprafeței externe a membranei eritrocitare. Aceeași constatare a fost posibilă prin intermediul unor marcheri radioizotopici fixați la nivelul galactozei terminale a glicolipidelor. Astfel, eritrocitele intacte, fantomele și veziculele eritrocitare pot fi marcate, pe cînd veziculele alcătuite din membrane inversate sînt nereactive la procedeele de marcare (114, 177). Glicolipidele cu 3 și 4 reziduuri de hexoze sînt cele mai intens marcate. Tratarea cu neuraminidază produce eliberarea acidului sialic terminal și, ca urmare, expunerea la radiotrasori crește.

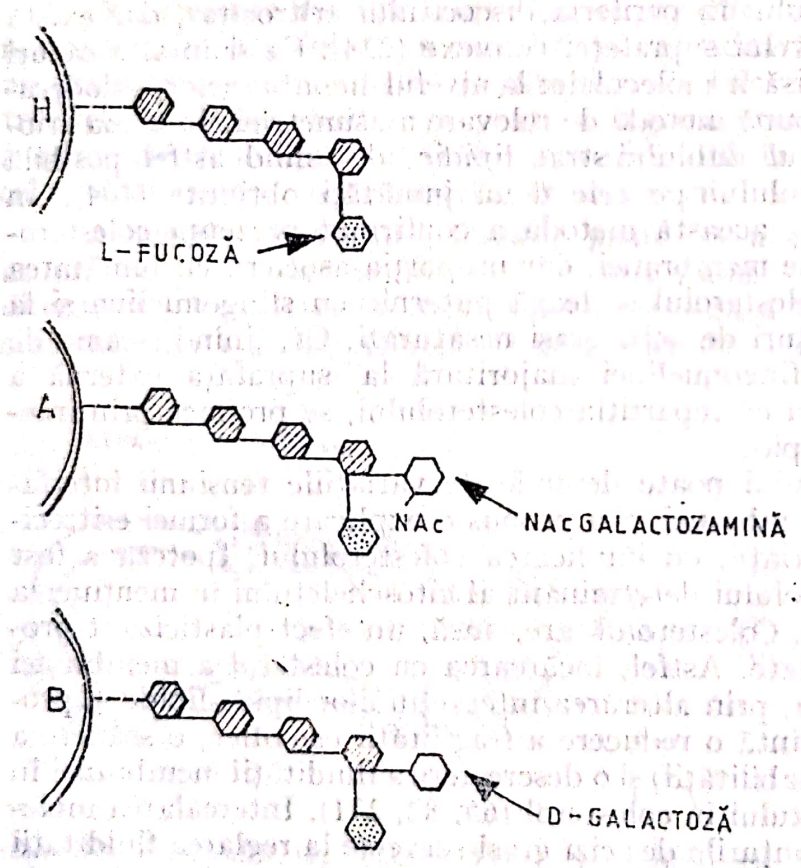


Fig. VII. 4 — Reprezentarea structurală simplificată a antigenelor ABO de grup sanguin de la suprafața eritrocitelor. Linia dublă reprezintă stratul bilipidic al membranei, iar liniile întrerupte glicolipidele sau glicoproteinele: cele 4 hexagoane haşurate moleculele glucidice. Se observă că L-fucoza este glucidul dominant al antigenului H; N-acetil galactozamina, al antigenului A; iar D-galactoza al antigenului B.

Se constată o importantă diferență cantitativă a compoziției membranei eritrocitare în glicosfinogolipide funcție de specia animală, de exemplu : om, iepure, pisică, bou (352). Informația conținută în glicolipide este determinată de partea hidrocarborantă din molecule. La eritrocitele umane deosebirile de fixare a hidraților de carbon la ceramidă constituie baza moleculară a specificității de grup sanguin (fig. 4).

În prezent a devenit posibilă manipularea biochimică a grupelor sanguine prin transformarea antigenelor de suprafață ABH din cadrul sistemului

Scanned with OKEN Scanner

ABO de grupe sanguine. Astfel prin intermediul α—galactozidazei eritrocitele conținînd antigen B pot fi convertite la grupa O, aceeași conversie fiind posibilă în cazul grupei A, prin utilizarea α—N—acetilgalactozaminidazei (128). Conversia nu afectează viabilitatea ulterioară a eritrocitelor.

În practica clinică determinarea sistematică a glicosfinogolipidelor eritrocitare nu este operantă, datorită metodelor de separare și dozare laborioase. De aceea, se tentează stabilirea unor valori de referință ale monozaharidelor din membrana hematiei și obținerea, pe această cale, a unei relații cu glicoconjugații membranari (36). Corelarea este posibilă, de exemplu, în cazul sistemului ABO de grup sanguin, deoarece hematiile A și AB purtătoare de antigen A sînt mai bogate în N—acetilgalactozamină, iar hematiile B și AB, conținînd antigene de grup B, conțin mai multă galactoză. Rezultate recente confirmă aceste supoziții, cu relevarea unor particularități: un conținut crescut de galactoză în cazul grupei O și, în mod surprinzător prezența în cantitate notabilă a manozei la toate celelalte trei grupe sanguine. Ori, manoza nu este cunoscută ca participînd la structurile antigenice ABH (36). Această particularitate rămîne de explicat.

1.1.4. *Metabolismul și reînnoirea lipidelor membranare*

Eritrocitul este incapabil să asigure sinteza *de novo* a acizilor grași sau a lipidelor majore din membrană. Totuși, lipidele sînt reînnoite constant prin două categorii de mecanisme: 1) schimburi cu plasma sanguină; 2) procese metabolice limitate, la nivelul membranei.

Studiul reînnoirii și menținerii lipidelor eritrocitare este indispensabil pentru precizarea patogeniei unor forme diverse de anemii hemolitice (76, 164, 171, 244, 291).

Există un schimb de fosfolipide între fața externă a membranei eritrocitare și plasmă. Studiat cu ajutorul fosfolipidelor marcate radioactiv, acest schimb prezintă următoarele caracteristici: 1) procesul se produce în afara unui transfer net al fosfolipidelor; 2) două fosfolipide de la nivelul stratului intern lipidic (fosfatidilserina și fosfatidiletanolamina) sînt mai stabile, schimbul desfășurîndu-se foarte lent; fosfatidilcolina încorporată este situată în cea mai mare parte în foița externă a stratului bilipidic (85, 29). Ultima constatare se bazează pe faptul că ^{32}P—fosfatidilcolina încorporată este degradată de fosfolipaza A_2, care acționează la suprafața membranei (323).

Calea metabolică implică formarea fosfolipidelor prin acilarea lizofolipidelor cu acizi grași și este concentrată îndeosebi pe suprafața internă a biomembranei. În acest sens, s-a constat că acizii grași încorporați în fosfolipidele membranei nu sînt accesibili degradării prin fosfolipaze (85).

Nu este încă suficient de clar procesul în urma căruia rezultă lizofosfolipide în membrana globului roșu. S-a afirmat recent existența unei fosfolipaze endogene la nivelul membranei eritrocitare, care ar cataliza eliberarea acizilor grași din fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina membranare (90). Deoarece plasma sanguină prezintă o activitate fosfolipazică A, constituie, mai plauzibil, sursa de lizofosfolipide. Tot în plasmă se află o cantitate mare de lizofosfolipide, îndeosebi lizofosfatidilcolină, care pot fi încorporate în membrana eritrociatară printr-un schimb pasiv rapid (151, 223). Acumularea de lizofosfatidilcolină la nivelul membranei poate conduce la modificări ale formei eritrocitare, permeabilității și fragilității osmotice (fig. 5). Fenomenele

Scanned with OKEN Scanner

se explică prin caracterul de detergent puternic, responsabil de modificări ale fazei lipidice membranare. S-a demonstrat, pe straturi bilipidice *in vitro*, în prezența lizolecitinei, tendința de dezorganizare a acestora în sensul formării de monostraturi. Modificări comparabile au fost relevate și în fuziunea celulară indusă de lizofosfatidilcolină (291). De aceea, reacțiile de acilare reprezintă nu numai un mecanism de reînnoire a unoa dintre fosfolipidele membranei, dar și un proces de detoxificare. De altfel, se susține producerea sub ac-

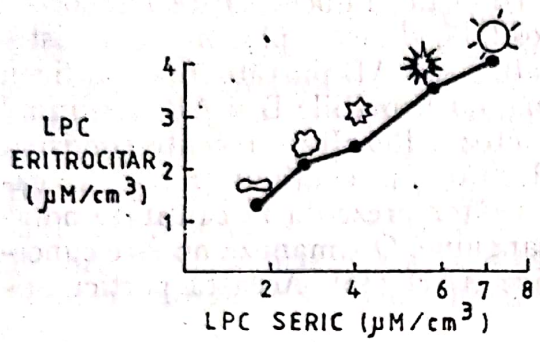


Fig. VII. 5 — Modificările morfologice ale eritrocitului consecutive creșterii lizofosfatidilcolinei (LPC) din membrană. Creșterea este indusă prin adăugarea de LPC exogenă în serul-mediu de suspensie pentru hematii, la 4°C (După S. B. Shohet, 1976) (291).

țiunea fosfolipazei B, care de asemenea ar fi prezentă în eritrocite, a unei reacții exclusiv de detoxifiere, în urma căreia lizofosfolipidele sînt convertite în acizi grasi liberi și glicerofosforilcolină, solubilă în apă (223).

În ceea ce privește colesterolul, eritrocitele îl sintetizează în cantitate foarte redusă. Reînnoirea colesterolului la nivelul membranei apare mult mai rapidă decît ar permite-o această sinteză nesemnificativă. Aproximativ 32% din colesterolul sanguin este asociat la membrana eritrocitară, restul fiind distribuit în diferitele fracțiuni lipoproteice din plasmă. De aici ipoteza existenței unui schimb al colesterolului din membrana eritrocitară cu colesterolul cuprins în lipoproteinele plasmatice. Schimbul s-ar produce doar pe seama fracțiunii de colesterol neesterificat din plasmă, implicarea esterilor de colesterol fiind foarte redusă. Procesul ar consta doar dintr-un simplu echilibru de schimb, între lipoproteine și membrana eritrocitară, ceea ce înseamnă că o moleculă de colesterol din membrană se schimbă cu o moleculă din colesterolul plasmatic. Aceste observații sînt mai vechi (140, 196, 224). Recent, însă, s-au obținut rezultate care sugerează coexistența a două sau mai multe căi de schimb al colesterolului la nivelul biomembranelor. Se disting cel puțin două fracțiuni de schimb: 10% din colesterolul total este schimbat rapid, iar 90% cu o rată de schimb lentă (190). Pornind de la conceptul curent al organizării membranei, cele două fracțiuni distincte de schimb ar putea reprezenta colesterolul de pe fețele internă și externă ale membranei. Ipoteza nu a fost confirmată, deoarece celulele intacte și veziculele „inversate", după depleția de colesterol, reintroduse în plasmă adiționează în mod egal colesterolul. Localizarea colesterolului nu ar fi, deci, un factor determinant al schimbului. Pe de altă parte, s-a demonstrat că mișcarea colesterolului în membrana eritrocitară se efectuează după un timp de înjumătățire relativ scurt (sub 50 minute), față de timpul de reînnoire al colesterolului din membrana eritrocitară, apreciat între 1,4 și 9,2 ore (323). Ca urmare, o serie de cercetări au încercat să explice existența celor două fracțiuni de schimb prin interacțiunea colesterolului cu acizii grași din fosfolipidele cu care molecula vine în contact. Prin utilizarea de vezicule fosfolipidice cu conținut diferit în acizii grași s-a

Scanned with OKEN Scanner

demonstrat un schimb mai rapid al colesterolului din veziculele conținînd acizi grași nesaturați (253). Fenomenul este perfect explicabil, deoarece colesterolul interacționează preferențial cu lanțurile scurte de acizi grași saturați. Pentru a completa ipoteza, nu este exclus ca și proteinele din membrană să influențeze schimbul colesterolului (323).

Mecanismul reînnoirii colesterolului membranar rămîne să fie elucidat, momentan fiind evidenți doi factori determinanți ai partiției acestuia între membranele eritrocitare și lipoproteinele plasmatice: 1) cantitatea de colesterol aflată în relație cu cantitatea de fosfolipide din fiecare compartiment; 2) activitatea lecitin-colesterol-aciltransferazei (LCAT), din plasmă, care probează existența unui mecanism de reglare a nivelului de colesterol schimbabil din plasmă, catalizînd reacția de schimb.

Colesterolul este „una dintre cele mai enigmatice molecule din biologia umană" (75). În primul rînd, ca un component structural esențial al biomembranelor și al lipoproteinelor, apoi pentru că este implicat cu certitudine în patogeneza unor boli diverse ca ateroscleroza, litiaza și anemia hemolitică. Controlul raportului colesterol-fosfolipide, relația sa cu celula, influența unor medicamente care scad acest raport în plasmă, precum și proporția colesterolului din biomembrane reprezintă probleme de prim rang ale cercetării.

În sinteză, există cel puțin 4 tipuri de molecule lipidice care pot fi transferate reversibil între plasmă și membrana hematiei (fig. 6): colesterolul (CL,

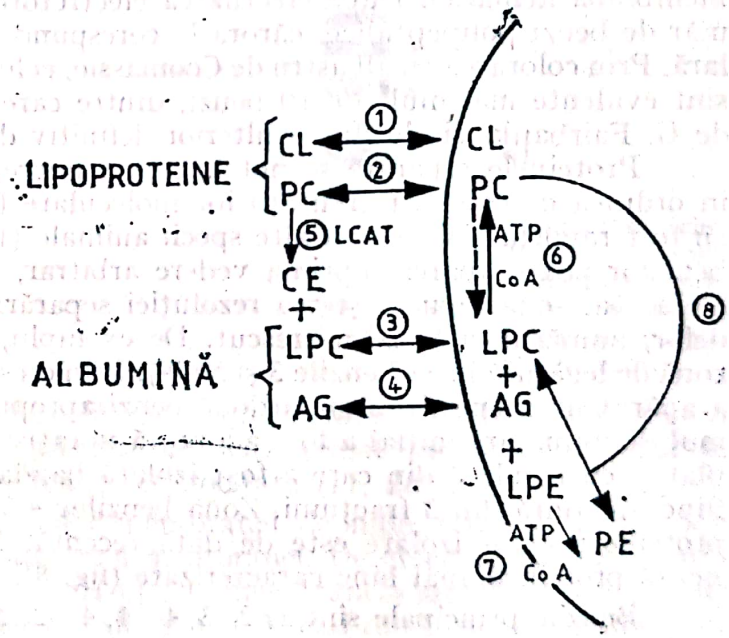


Fig. VII. 6 — Metabolismul lipidelor de la nivelul membranei eritrocitare (După S. B. Shohet, 1976, modificat) (291).

reacția 1) și fosfatidilcolinele (PC, reacția 2) de la nivelul lipoproteinelor; lizofosfatidilicolinele (LPC, reacția 3) și acizii grași (AG, reacția 4). Enzima plasmatică lecitincolesterol aciltransferaza (LCAT, reacția 5) care catalizează transferul acidului gras din poziția 2, dintr-o moleculă de lecitină la o moleculă de colesterol, are rolul de a menține constant (circa 0,5) raportul colesterol/colesterol esterificat. Ea reglează astfel în mod indirect colesterolul eritrocitar, deoarece doar colesterolul liber participă la schimburi. Membrana este sediul reacțiilor de acilare (6,7 pe figură) prin care glicerofosfolipidele sînt

Scanned with OKEN Scanner

sintetizate din lizoderivații corespondenți și din acizi grași. Originea lizofosfatidilcolinelor poate fi plasmatică sau membranară. Ar exista, de asemenea, un transfer direct de acizi grași între fosfatidilcolinele (PC) și fosfaditiletanolamine (PE), cu formare de LFC și PE (reacția 8). Echilibrarea compoziției moleculare între cele două zone ale stratului bilipdic s-ar opera îndeosebi prin mecanismul de *flip-flop*.

Patologia eritrocitară derivată din perturbările acestor mecanisme (și a altora, din cadrul aceluiași proces, necunoscute încă) este diversă, dar în esență ca poate rezulta din: a) o anomalie plasmatică; b) un deficit localizat la nivelul membranei; c) prezența hemoglobinelor anormale care stimulează uneori degradarea de origine peroxidazică a lipidelor membranare.

1.2. Proteinele din membrana eritrocitului

Dacă datele asupra compoziției proteice asupra majorității membranelor sînt încă puține, identificarea și caracterizarea proteinelor de la nivelul membranei eritrocitare este mult mai avansată, o contribuție deosebită aparținînd cercetătorilor T.S. Steck, V.T. Marchesi, G. Guidotti și G. Fairbanks (99, 119, 135, 136, 137, 203, 204, 261, 307, 308).

Punerea la punct a electroforezei în gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu (SDS) a revoluționat cunoașterea proteinelor din membrana hematiei. După efectuarea electroforezei se separă un anumit număr de benzi polipeptidice, cărora le corespunde o anumită greutate moleculară. Prin colorarea cu albastru de Coomassie, colorant nespecific al proteinelor, sînt evidente mai mult de 10 benzi, dintre care 7 majore identificate inițial de G. Fairbanks și clasificate ulterior definitiv de T.S. Steck (fig. 7).

Proteinele separate se notează cu numere, începînd de la catod, deci, în ordinea descreșterii greutății lor moleculare (307). Separări asemănătoare au fost raportate și pentru alte specii animale (193). Sistemul de numărare a benzilor poate apărea la prima vedere arbitrar, dar el s-a dezvoltat treptat. De aceea, odată cu creșterea rezoluției separării, prin perfecționarea metodelor, numărul de benzi a crescut. De exemplu, inițial banda 4 apărea ca o zonă de legătură între benzile 3 și 5 (99). Prin creșterea rezoluției această bandă a apărut ulterior sub forma a două benzi apropiate. Pentru a prezerva sistemul de numărare inițial a fost adoptată notația 4.1. și 4.2 Tot așa s-a întîmplat și cu banda 2 din care a fost izolată banda 2.1, ulterior, considerată ca fiind alcătuită din 3 fracțiuni. Zona benzilor 4.3 pînă la 5 conține mai multe proteine a căror izolare este de dată recentă. Numerele adiționale consemnează proteinele mai bine caracterizate (fig. 8).

Benzile principale sînt 1, 2, 3, 4—1, 4—2, 5, 6 și 7. Colorarea cu acid periodic Schiff (PAS), colorant specific al glicoproteinelor permite punerea în evidență a încă 4 benzi, conținînd proteine bogate în glucide, deci, glicoproteine și desemnate prin simbolurile PAS—1, PAS—2, PAS—3 și PAS — 4 (tabelul III). Ele se notează și prin literele A, B, C, D. Trebuie subliniat că benzile reperabile prin electroforeză corespund proteinelor abundent reprezentate în membrană. Este sigur că multe proteine, dintre care unele cu roluri importante, nu sînt vizibile electroforetic. Unele din benzile majore conțin o serie de polipeptide care au migrat împreună cu componentul principal al benzii. De exemplu, cîteva polipeptide minore cantitativ (nu obli-

Scanned with OKEN Scanner

gatoriu funcțional) migrează în regiunea benzii 3, ca, de exemplu (Mg^{2+})—ATP—aza (345). Alte specii de proteine ca (Na^+, K^+)—ATP—aza, întrucît se află într-un număr redus de copii la nivelul membranei sînt nedetectabile prin electroforeza uzuală (14). În scopul sporirii creșterii sensibilității

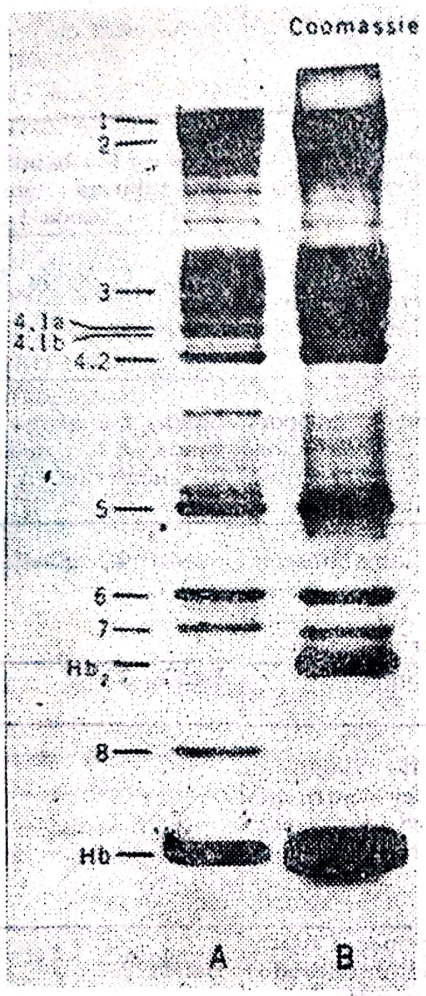


Fig. VII. 7 — Separarea proteinelor din membrana eritrocitară prin electroforeză în gel de poliacrilamidă — SDS: A) membrane eritrocitare; B) aceleași membrane după colorare Coommasie (După T. L. Steck, 1978) (409).

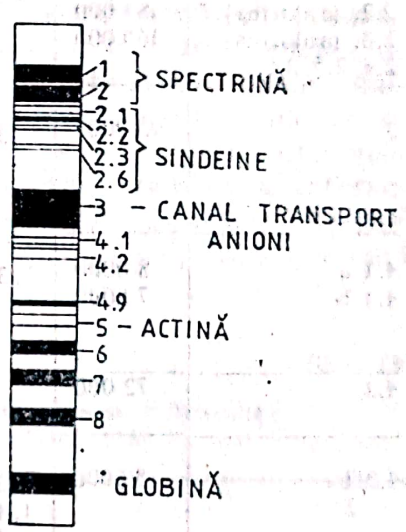


Fig. VII. 8—Reprezentare schematică a proteinelor separate din membrana eritrocitară prin electroforeză în gel de poliacrilamidă — SDS, cu denumirile curente ale benzilor.

detecției s-a propus electroforeza bidimensională, care permite rezoluția unui mare număr de proteine. Se apreciază că prin această metodă sînt separate circa 200 de proteine ale membranei eritrocitare (11, 265).

Modelul normal al proteinelor membranei depinde sensibil de metoda de preparare și de gradul de spălare a membranei. De obicei după liza hematiilor în 5 mM tampon-fosfat, la pH-ul 8,0 membranele sînt separate și spălate cu aceeași soluție tampon. Benzile 4.3 și 7 scad după fiecare spălare, în timp ce banda 8 și globina dispar după 5 spălări. Cantități reduse din benzile 1 și 2 se pot pierde în timpul lizei *in vitro* și prin procedeele de spălare (18). În unele stări patologice este dificil să se prepare membrane necontaminate de hemoglobină, ca urmare globina va fi intens reprezentată în urma electroforezei.

Proteinele astfel izolate au constituit subiectul a numeroase cercetări efectuate în scopul cunoașterii propietăților, asocierilor și funcțiilor acestora în membrana eritrocitară (tabel III).

Scanned with OKEN Scanner

TABEL III

Proprietăţile, asocierile şi funcţia proteinelor din membrana eritrocitului de om
(Date din literatură reunite de C.W.M. Haest, 1983, modificat) (139)

Proteina (banda)	Greutate moleculară (daltoni)	Numărul de copii pe celulă ($\times 10^5$)	Stare de asociere moleculară	Funcţie	Asociere cu
1 (spectrina) 2 (spectrina)	240 000 220 000	2,2	Heterodimeri Tetrameri Oligomeri	Componente ale citoscheletului eritrocitar	Banda 3 (cu banda 1), ankirina (cu banda 2), banda 4.1
2.1 (ankirina) 2.2. (ankirina) 2.3. (ankirina) 2.4, 2.5, 2.6.	210 000 183 000 165 000	1, 1	Monomer	Conectează citoscheletul cu domeniul intrinsec	Banda 1, banda 3
3	95 000	12	Tetrameri în echilibru cu dimeri	Sistem de transport pentru anioni anorganici. Loc de atașare citoschelet	Banda 1 ankirină, banda 4.2, banda 6, glicoforină A
4.1 a 4.1 b	8 0000 7 8000	2,3	Dimeri?	Conectarea citoschelet-proteine integrale. Interacţiunea spectrină-actină	Spectrină, glicoforină C
4.2	72 000		Tetramer	Necunoscut	Banda 3
4.5/1 2 3 4 5 6	59 000 52 000	1,3 1,4 0,7 1,0 1,3 1,3		Posibil: sistem de transfer pentru monozaharide, acid L-lactic și nucleozide	
4.9	48 000	1,0		Componentă a citoscheletului (produs de degradare?)	Banda 2
5 (actina)	43 000	5, 1	Oligomeri (din 10 monomeri)	Componentă a citoscheletului	Spectrina, banda 4.1
6	35 000	4, 1	Tetramer	Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza	Banda 3, spectrină-actină
7	29 000				
Glicoforina A (PAS-1)	31 000 (monomer)	2	Dimer		Banda 3
Glicoforina B (PAS-2)	35 000	0,7	Monomer?		
Glicoforina C (PAS-3)	25 000	0,35	Monomer?	Loc de legare a citoscheletului	Banda 4.1
Glicoforina D (PAS-4)					

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1. — *Clasificarea topografică și funcțională a proteinelor*

Prima discriminare utilă care se poate efectua constă în diferențierea în raport cu localizarea la nivelul membranei celulare. Stabilirea distribuției topografice a proteinelor în membrană a fost posibilă prin combinarea eluției selective, a proteolizei prin proteaze exogene și a unor metode cu markeri chimici (243, 330). Din acest punct de vedere există două tipuri de proteine: 1) *extrinseci sau periferice* și 2) *intrinseci sau integrale*. Deoarece proteinele corespunzînd benzilor 1, 2, 4, 5, 6 și 7 pot fi extrase din membrană modificînd forța ionică sau pH-ul mediului, ele sînt considerate extrinseci. În plus, ele nu sînt afectate la globulele roșii intacte sau fantomele eritrocitare închise tratate cu o serie de enzime proteolitice. Dimpotrivă, ele sînt profund alterate prin digestia proteolitică cu proteaze a fantomelor deschise. De aici rezultă că proteinele extrinseci menționate sînt localizate pe fața internă, citoplasmatică a membranei hematiei (317). Hemoglobina și cea mai mare a enzimelor intraeritrocitare (excepție făcînd aldolaza, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza și piruvatchinaza) sînt legate la fața internă a membranei eritrocitare prin interacțiuni electrostatice nespecifice și, de aceea, nu sînt considerate drept proteine membranare. S-a demonstrat că structura și interacțiunile proteinelor periferice sînt un determinant major în menținerea formei și integrității eritrocitului. Acest aspect va fi prezentat în secțiunea dedicată citoscheletului membranei.

TABEL IV

Clasificarea proteinelor în raport de topografia în membrana eritrocitară
(După S. K. Ballas și S. H. Krasnow, 1980) (18)

I — *Proteine integrale sau intrinseci;*
- A — Banda 3 (proteine de transport pentru anioni).
- B — Glicoproteine (glicoforina) A, B, C, D.
- C — ATP-aza (Na^+, K^+).
- D — Antigene de grup sanguin: lipoproteine Rh.

II — *Proteine periferice sau extrinseci;*
- A — Proteine situate la nivelul fetei citoplasmatice:
  - 1 — benzile 1 și 2 (spectrina)
  - 2 — proteine asociate cu spectrina
    - a — banda 2.1 (ankirina)
    - b — benzile 2.1—2.6 (sindeine)
    - c — benzile 4.1—4.2
  - 3 — banda 5 (actina)
  - 4 — banda 6 (gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza)
  - 5 — banda 7
- B — Proteine situate pe fața externă a membranei:
  - 1 — Acetilcolinesteraza.
  - 2 — Antigenele de grup sanguin.

A doua grupă de proteine, integrale sînt extrase din membrană doar în urma unor tratamente violente, cu detergenți puternici deoarece străbat complet membrana: proteina din banda 3 și toate cele 4 glicoproteine PAS-1-PAS—4.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul IV conține o clasificare în funcție de dispoziția topografică a unor proteine din membrana hematiei. După cum se observă din tabel o serie de proteine conținute în benzile majore au o denumire, cu excepția polipeptidelor din banda 3, 4 și 7, ultimele două fiind mai puțin cunoscute.

Deoarece proteinele conferă expresia funcțiilor membranei este utilă o clasificare a acestora și din acest punct de vedere (tabel V). Ambele clasificări sînt perfectibile, datele noi care apar completîndu-le continuu.

TABEL V

Clasificarea funcțională a proteinelor din membrana hematiei
(După S. K. Ballas și S. H. Krasnow, 1980) (18)

I — *Proteine structurale sau de suport;*
- A — Spectrină (benzile 1 și 2).
- B — Ankirină (banda 2.1)
- C — Sindeine (benzile 2.1—2.6).
- D — Actină (banda 5).

II — *Proteine catalitice;*
- A — Proteine de transport pentru anioni (banda 3).
- B — ATP-ază (Na^+, K^+).
- C — Transport al glucozei (banda 4.5).
- D — Alte enzime.

III — *Proteine de contact sau receptoare;*
- A — Glicoforine A, B, C, D.
- B — Antigene de grup sanguin.

1.2.2. — *Descrierea unor proteine intrinseci*

Banda 3 reprezintă proteina intrinsecă majoră (circa 25% din totalul proteinelor membranei și 50—60% din fracțiunea intrinsecă). Lanțul său polipeptidic traversează stratul dublu lipidic al membranei de cel puțin 5 ori, avînd o dispoziție asimetrică, cu extremitatea N-terminală spre citoplasmă și cu extremitatea C-terminală în afara celulei. Nu este exclusă existența unei familii de proteine cu greutate moleculară între 90 și 100 Kd. Particulele intramembranare observate pe replicile obținute prin criofractură corespund în majoritate proteinelor din banda 3, aflate probabil sub formă tetramerică.

Deoarece proteina banda 3 catalizează transportul de anioni, ea constituie obiectul unei „disecții" aprofundate. Atacul proteolitic pe eritrocitul intact duce la eliberarea unui peptid cu masa de 35 000 d, care conține totalitatea glucidelor. Digestia proteolitică pe eritrocitul permeabilizat produce eliberarea unui peptid suplimentar cu masa 44 000 d. Un peptid conținînd peste 100 resturi de aminoacizi nu este sensibil la atacurile proteolitice, fiind deci „îngropat" în corpul hidrofob al membranei. În zona hidrofobă a membranei avînd o grosime de 4 mm, sînt suficiente circa 20 resturi pentru traversarea sa. De aici, concluzia că proteina traversează membrana de cel puțin 5 ori (fig. 9). Este important faptul că această dispoziție pare caracteristică proteinelor asociate transportului de solviți. Proteina a fost studiată atît prin solubilizarea sa din banda 3 cît și la nivelul membranei. În cazul izolării și purificării s-a invocat, în mod logic, probabilitatea denaturării proteinei

Scanned with OKEN Scanner

și s-au imaginat procedee sofisticate pentru menținerea sa în stare nativă. De asemenea, după purificare cu detergenți nonionici s-a reușit încorporarea sa în lipozomi. Pentru înțelegerea mecanismelor de transport de la nivelul „canalului" proteic au fost utilizate metode de spectroscopie. Recent, prin analiza spectrelor de dicroism circular numărul de molecule proteice de la nivelul fiecărui eritrocit a fost estimat la $1{,}3 \cdot 10^6$ (24, 165, 182, 241, 273, 309). Rămîne încă în discuție dacă banda 3 constituie și un agent formator de „pori" mediatori ai transportului de apă, în adiție la rolul de schimb anionic. În modelele moleculare porul apos este localizat între doi monomeri, la nivelul legăturii noncovalente a formei dimerice. Dimpotrivă, recon-

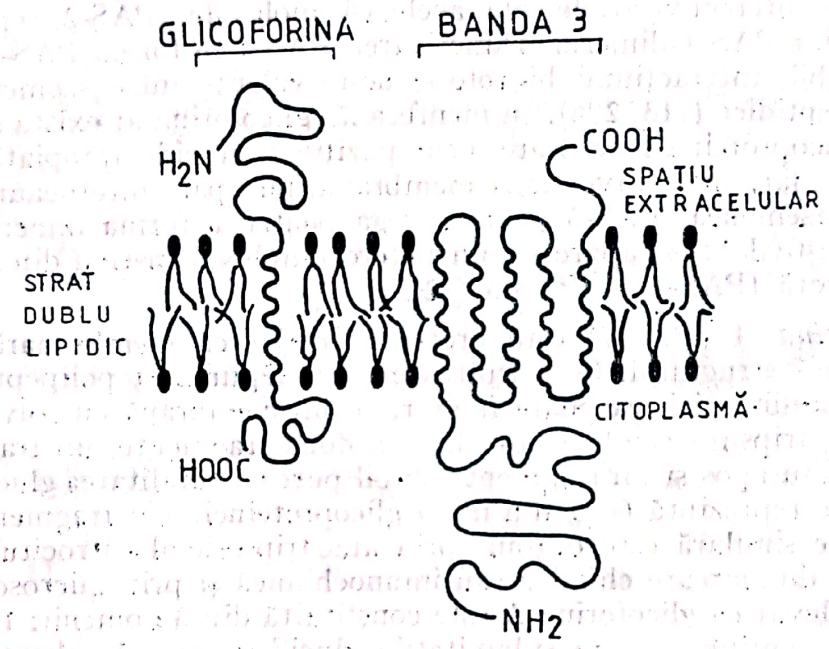


Fig. VII. 9 — Schemă reprezentînd dispunerea posibilă a benzii 3 în membrana hematiei umane; glicoforina este prezentată cu titlul de comparație. Nu se cunoaște aranjarea exactă a benzii 3 în membrană, dar s-a probat că ea traversează de mai multe ori stratul bilipidic. De notat că în timp ce extremitatea aminată a glicoforinei este la exterior, extremitatea aminată a benzii 3 ar fi la interior (După B. Alberts și colab., 1986) (4).

stituirea proteinei din banda 3 în straturi bilipidice planare pare să indice forma tetramerică drept „por" (28, 51, 248, 303). Gh. Benga și colab. au obținut date care ar proba că proteina 3 mediază transportul apei prin membrana eritrocitară împreună cu banda 4.5. Este disputată existența în banda 3 a unei zone glucidice, comparabilă cu cea a glicoforinei A (110).

Proteina 4.5 a fost identificată ca transportor al monozaharidelor. Sistemul de transport al glucozei prin difuziune facilitată este virtual prezent în toate țesuturile animale. De aici decurge, ca de altfel și în cazul altor proteine eritrocitare, perspectiva extrapolării datelor și la alte celule. La nivelul eritrocitului, proteina este în mod particular abundentă, constituind circa 5% din totalul proteinelor. Asupra greutății sale moleculare existau controverse, considerîndu-se că proteina de 55 Kd ar fi un fragment proteolitic al transportorului de 100 Kd și a proteinei de 55 Kd ca formă nativă a trans-

portorului monozaharidelor (6, 198). Este posibil ca aceeași proteină să constituie un sistem de transfer pentru L-lactat și nucleozide (159, 218).

Glicoproteinele „majore", PAS 1—PAS 4, suficient de abundente pentru a fi puse în evidență, au o structură generală comparabilă (98, 322). Partea lor glucidică proemină exclusiv pe fața externă a membranei. Partea proteică traversează membrana și se „ancorează" în citoplasmă. Lanțurile oligozaharidice sînt legate de lanțul polipeptidic, cel mai frecvent, la nivelul reziduurilor de serină sau treonină, mai rar la nivelul asparaginei ori, excepțional, la reziduurile cistinei.

PAS-1 și PAS-2 reprezintă 75% din totalitatea glicoproteinelor și sînt două forme interconvertibile ale aceleiași molecule, PAS-2 reprezentînd monomerul, iar PAS-1 dimerul. Dimerizarea PAS-2 în forma PAS-1 este datorată probabil, interacțiunii hidrofobe noncovalente între segmentele lanțurilor polipeptidice (113, 296). În membrană, glicoforina ar exista sub formă de dimer. Glicoproteina PAS-3 are o compoziție în glucide apropiată de cea a glicoforinei 1 dar, deși traversează membrana, nu apare întotdeauna pe fața internă. De asemenea, PAS-3 poate agrega pentru a forma dimeri (80). În ceea ce privește PAS-4, apare ca un heterocomplex, constînd din sialoglicoproteina majoră (PAS-1) și PAS-3 (322).

Glicoforina A (PAS-1) este proteina intrinsecă membranară cel mai bine cunoscută structural. Constituită dintr-un singur lanț polipeptidic alcătuit din 131 aminoacizi, ea poate fi extrasă din membrană cu solvenți organici. Un atac tripsinic conduce la izolarea a două fragmente, un fragment insolubil în mediu apos și un fragment solubil purtînd totalitatea glucidelor din proteină, care reprezintă 60% din masa glicoproteinei. Un fragment solubil de compoziție similară este obținut prin atac tripsinic al eritrocitului întreg. Experimente de marcare chimică sau imunochimică și prin microscopie electronică au relevat că glicoforina A este constituită din 3 domenii: 1) regiunea N-terminală, conținînd toate subunitățile glucidice, este localizată pe fața externă a membranei; 2) regiunea mediană, hidrofobă, încorporată în dublul strat lipidic al membranei; 3) regiunea C-terminală, conținînd lanțuri laterale polare și ionizate, etalată pe fața internă a membranei (317).

Glicoforina este prima proteină intrinsecă a membranei a cărei secvență a fost determinată (fig. 10). Analiza globală procentuală a compoziției în aminoacizi a proteinelor intrinseci nu a permis punerea în evidență a unor diferențe semnificative în raport cu compoziția proteinelor globulare solubile. Dimpotrivă, după precizarea secvenței au fost observate diferențe importante. Astfel, s-a constat că glicoforina A prezintă, în lanțul polipeptidic o distribuție neomogenă a acizilor aminați cu resturi hidrofile și hidrofobe. Glicoforina conține între regiunile N și C terminale mult mai hidrofile, o secvență alcătuită din 21 aminoacizi hidrofobi. Această secvență are exact lungimea necesară pentru traversarea stratului dublu lipidic (112, 203, 327).

Segmentul hidrofob, obținut prin acțiunea tripsinei asupra moleculei întregi, poate fi solubilizat cu detergenți. Studiul prin dicroism circular, care permite detectarea structurilor secundare ale proteinelor, arată că această porțiune a lanțului polipeptidic adoptă o structură α-elicoidală. Formarea unei structuri secundare ordonate, într-un mediu hidrofob, este un factor favorabil din punct de vedere energetic. Aceasta deoarece structurile secundare de tip α-helix sau de tip β-pliat sînt stabilizate prin legături de hidrogen

Scanned with OKEN Scanner

între oxigenul din CO și hidrogenul din NH al grupărilor peptidice, ceea ce permite izolarea acestor grupări hidrofile respective de mediul hidrofob înconjurător (48, 119, 203, 286, 322, 327).

Există mai multe argumente care probează o asociere între proteina benzii 3 și glicoforină (112). Din această asociere ar rezulta microprotuberanțele de 8 nm de pe fața internă a foițelor membranare, observate prin criofractură.

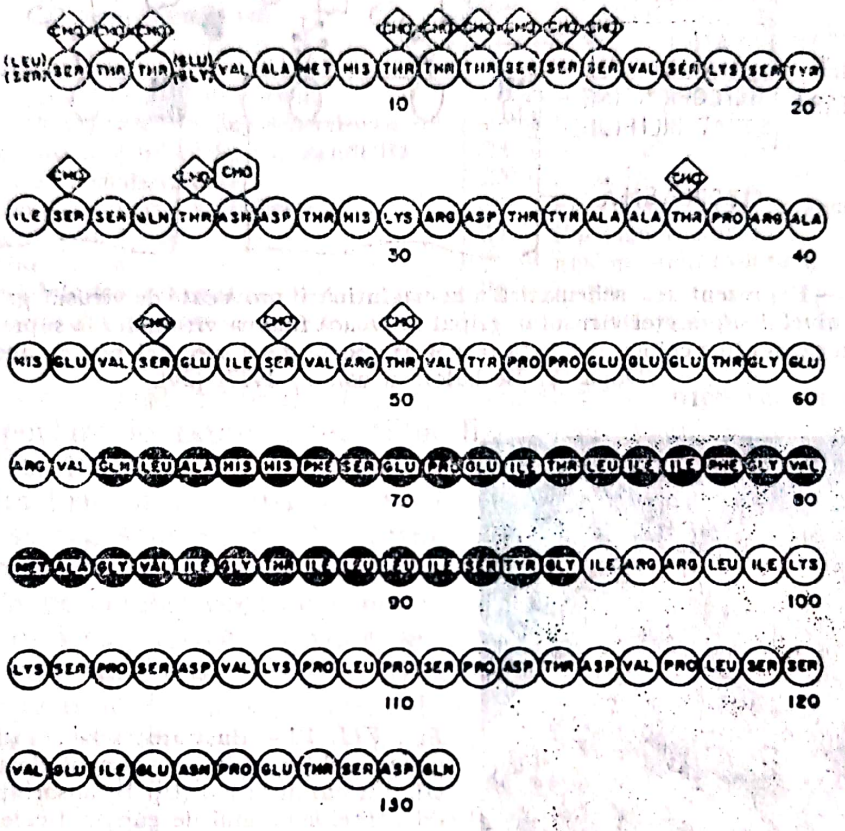


Fig. VII. 10 — Secvența aminoacizilor componenți ai sialoglicoproteinei majore (PAS 1) din membrana eritrocitară. Cerculețele înnegrite desemnează partea din lanțul polipeptidic care străbate stratul dublu lipidic (După V. T. Marchesi și colab., 1976) (204).

Rolul glicoproteinelor eritrocitare, sialoglicoproteine deoarece zona glucidică terminală conține acid sialic, este în curs de clarificare. Ele prezintă antigene de grup sanguin MN, sînt receptori pentru mixovirusuri și hemaglutinine (fig. 11, 12). De asemenea, ar putea fi sediul activităților antigenice H și I (12, 46, 110). O altă funcție constă în menținerea caracteristicilor structurale ale membranei, prin componență glucidică negativă, opunîndu-se pătrunderii proteinelor de care sînt legate și a sfingolipidelor în grosimea hidrofobă a membranei.

Cunoașterea glicoforinei este utilă și în măsura în care numeroase proteine transmembranare prezintă secvențe hidrofobe, constituite dintr-un număr de circa 20 de amonoacizi.

Asimetria moleculei de glicoforină permite, de asemenea, o constatare de ordin general. Astfel, s-a demonstrat prin utilizarea lectinelor că unitățile

glucidice sînt localizate întotdeauna la suprafața celulelor. Rolul lor, foarte probabil, constă în orientarea glicoproteinelor în membrane și în recunoașterea intercelulară (317).

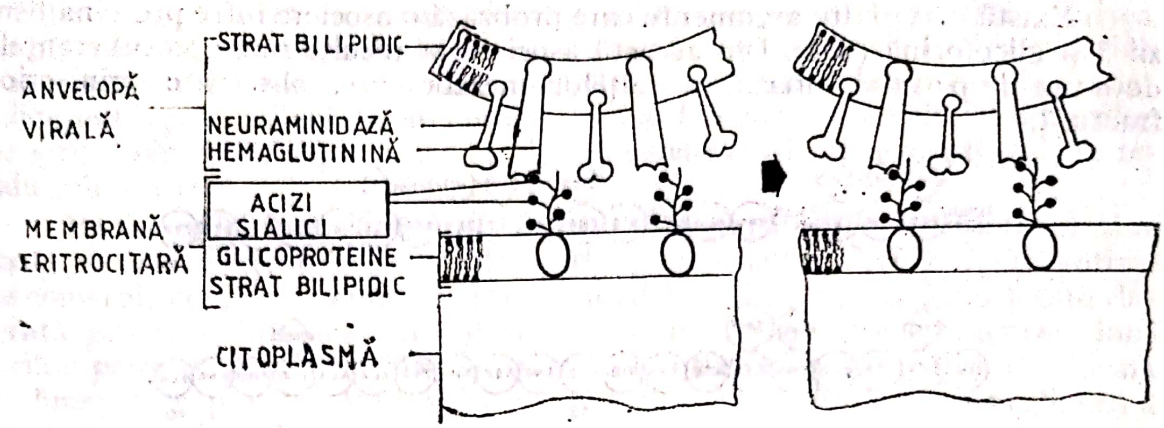


Fig. VII. 11 — Reprezentarea schematică a hemaglutinării provocate de virusul gripal. Hemaglutinina de la nivelul suprafeței virusului gripal provoacă fixarea virionului la suprafața hematiei, care, ca și în cazul altor celule, prezintă receptori glicoproteici specifici pentru această proteină (După A. Berkaloff și colab., 1977) (29).

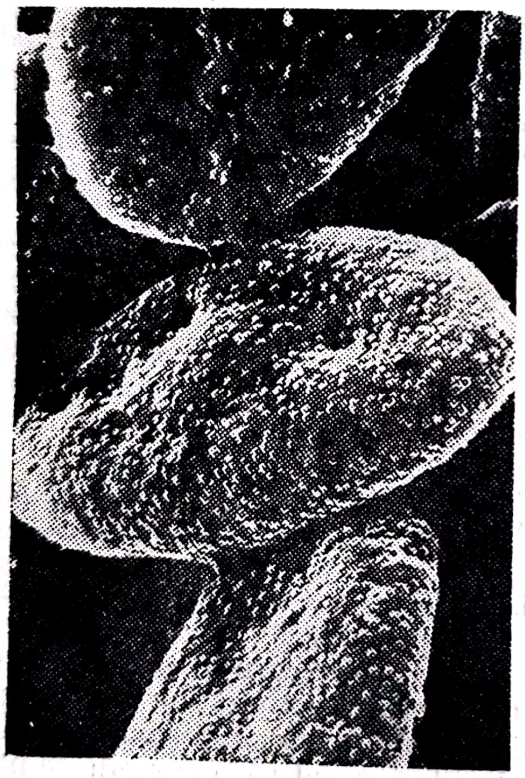


Fig. VII. 12 — Ilustrarea schemei din fig. 11 cu o imagine obținută la microscopul electronic cu baleiaj. Virioni ai gripei (tip B) adsorbiți pe suprafața eritrocitelor puiului de găină. Unele virusuri formează punți între două eritrocite, provocînd hemaglutinare.

1.2.3. *Enzimele asociate cu membrana eritrocitară*

La nivelul eritrocitului au fost identificate o serie de proteine enzimatice ale căror relații structurale cu membrana nu sînt încă precizate (tabel VI). Cu excepția cîtorva proteine, incluse solid în edificiul membranar, majoritatea rămîn greu de caracterizat. Acestea din urmă par să aparțină deopotrivă membranei și citoplasmei, asocierea cu membrana fiind redusă.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL VI

Unele activități funcționale asociate cu membrana eritrocitului de om

(Date din literatură, reunite de M. Tao, 1982) (323)

1 — Acetilcolinesteraza	16 — GTP-aza
2 — Acil-CoA ligaza	17 — Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
3 — Adenilatchinaza	18 — Poteine legate la guanin-nucleotid
4 — Carnitin-palmitin-transferaza	19 — Hexochinaza
5 — Catalaza	20 — Receptor specific pentru insulină
6 — (Ca, Mg)-ATP-aza	21 — NADH-citocrom C reductaza
7 — CoA-lizofosfolipid aciltransferaza	22 — NADP glicohidrolaza
8 — Proteinchinaza AMP-ciclic dependentă	23 — (Na^+, K^+)-ATP-aza
9 — Proteinchinaza AMP-ciclic independentă	24 — 3-Fosfogliceratchinaza
10 — AMP-ciclic fosfodiesteraza	25 — Fosfolipaza
11 — 2', 3'-Ciclic nucleotid fosfodiesteraza.	26 — Fosfolipidid metiltransferaze
12 — Citocrom b_5 și P-420	27 — Fosfofructochinaza
13 — Digliceridchinaza	28 — Fosfoprotein-fosfataza
14 — Fructoză-bifosfat aldolaza	29 — Proteaze
15 — Transportorul de glucoză	30 — Piruvatchinaza

Totodată, s-a sugerat că interacțiunea enzimelor cu membrana poate avea un rol important în expresia funcțiilor fiziologice cum ar fi rata glicolizei *in vivo* (176, 180).

Dintre toate aceste enzime, cea mai studiată rămîne (Na^+, K^+)-ATP-aza, care se regăsește la nivelul tuturor membranelor celulelor eucariote. În membrana hematiei ea se află într-un număr mult mai redus de copii (cîteva sute pe celulă), ceea ce conduce și la o diminuare corespunzătoare a activității de ieșire activă a ionilor de sodiu și de intrare activă în celulă a ionilor de potasiu. Ca și în cazul celorlalte celule, reacția catalizată de (Na^+, K^+)-ATP-ază pune în joc un intermediar fosforilat al enzimei: radicalul fosforil obținut din ATP care se leagă covalent efemer la ATP-aza (Na^+, K^+). Acest marcaj natural a permis identificarea electroforetică a enzimei. (Na^+, K^+)-ATP-aza a fost identificată în regiunea benzii 3, unde reprezintă sub 1% din masa totală. Este o proteină integrală, conținînd un polipeptid de circa 95 Kd și o unitate glicoproteică de 45 Kd situată la nivelul feței externe a membranei (309).

(Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATP-aza, de asemenea, prezentă la cuasitotalitatea celulelor eucariote, este situată pe fața internă a membranei, probabil, în asociere cu spectrina (138).

La eritrocitul de om, funcția (Ca^{2+}, Mg^{2+})-ATP-azei constă în extruzia Ca^{2+} din celulă, astfel încît să se mențină o concentrație de circa 1 μM (277). Creșterea intracelulară a Ca^{2+} produce alterări diverse la nivelul globulelor roșii, incluzînd modificări ale formei și deformabilității, scurtarea duratei de viață și o scădere selectivă a K^+ (131, 186, 341). Recent s-a demonstrat activarea pompei de Ca^{2+} prin legarea complexului Ca^{2+}-calmodulină cu ATP-aza. În afara calmodulinei și alte proteine pot fi implicate în reglarea activității ATP-azice a membranei. Astfel, a fost izolată o proteină cu greutatea moleculară mare, care ar avea un efect modulator asupra calmodulinei (100, 208).

Membrana eritrocitară conține mai multe proteinchinaze care catalizează fosforilarea anumitor proteine membranare. S-a precizat că locurile lor catalitice se află pe fața internă a membranei. Activitatea globală pro-

Scanned with OKEN Scanner

teinchinazică a membranei hematiei diminuă progresiv, pe măsura creşterii vîrstei celulei.

Adenilatciclaza, situată pe faţa internă a membranei şi cuplată cu receptorii β-adrenergici de la suprafaţa celulei, a fost studiată îndeosebi la hematiile nucleate ale păsărilor. La om nu s-a putut pune în evidenţă cuplarea între receptorii adrenergici şi adenilatciclază. Activitatea enzimei diminuă cu vîrsta, iar prostaglandinele E_1 şi E_2 îi stimulează activitatea. Este posibil ca adenilatciclaza să reprezinte doar un vestigiu al perioadei intramedulare a globulului roşu. Totuşi, faptul că la eritrocitele de pasăre unii agenţi β-adrenergici (L-izoproterenol) stimulează fosforilarea unei proteine membranare şi, concomitent, permeabilitatea la sodiu, sugerează un rol fiziologic al enzimei.

O altă serie amplă de proteine enzimatice au fost descrise doar indirect, pe calea interacţiunilor specifice.

La nivelul suprafeţei hematiei se află probabil şi o serie de receptori, certă fiind existenţa receptorului pentru insulină, aşa cum se va constata în secţiunea rezervată modificărilor patologice. De asemenea, membrana eritrocitară interacţionează la concentraţii nanomolare şi cu alte substanţe biologic active. Astfel, în afară de insulină (146), ea posedă locuri de legătură pentru hormonul de creştere (264), acetilcolină (257), agenţi β-adrenergici (257) şi prostaglandine (185). Receptorul celei mai severe forme de malarie, cauzată de *Plasmodium falciparum*, ar fi localizat la nivelul acidului sialic sau al reziduurilor de N-acetilglucozamină din zona terminală a glicoforinei A şi, de asemenea, pe lanţurile de poli-N-acetil-lactozamină ale benzii 3 (109, 174). În mai multe cazuri, fixarea la nivelul suprafeţei eritrocitare a unui număr relativ mic de molecule conduce la rezultate detectabile, exprimate prin perturbarea semnalelor produse de marcheri fluorescenţi sau de spin, ori prin fosforilarea proteinelor intracelulare.

2. CITOSCHELETUL SAU SCHELETUL MEMBRANEI ERITROCITARE

Una dintre consecinţele cele mai pozitive ale extraordinarei „disecţii" moleculare la care este supusă membrana eritrocitară constă în demonstrarea existenţei indiscutabile a citoscheletului. Proteinele implicate în constituirea acestui ansamblu molecular nu formează, *stricto-senso*, un citoschelet, deoarece ele nu pătrund în întreaga masă citoplasmatică, aşa cum se întîmplă în cazul altor celule. Citoscheletul eritrocitar este o reţea flexibilă situată în imediata vecinătate a membranei eritrocitare, pe care o susţine. Pentru a marca această particularitate se preferă desemnarea sa sub termenul de *schelet al membranei*.

Concomitent, structura particulară a citoscheletului eritrocitar poate fi considerată ca expresia moleculară a adaptării celulei la disparitatea dintre diametrul său (7—8 μm) şi diametrele capilarelor (frecvent între 3—5 μm) accentuată de faptul că reţeaua capilară se întinde în organism pe circa 350 km.

Experienţe clasice au arătat că glutaraldehida abolește deformabilitatea hematiilor (66). Cum acest reactiv bifuncţional permite formarea de legături covalente între proteine, rezultatul sugera clar că proteinele trebuie

Scanned with OKEN Scanner

să constituie baza moleculară a deformabilității eritrocitare. Prin extracția, izolarea și caracterizarea, deocamdată parțială, a proteinelor extrinseci ale membranei, a devenit posibilă descrierea coerentă a scheletului acestuia.

Ca o consecință a interesului particular acordat citoscheletului eritrocitar a rezultat o bibliografie extrem de întinsă (referințe mai importante: 19, 22, 34, 70, 72, 130, 134, 162, 183, 195, 200, 201, 236, 245, 246, 288, 293, 339), dar și o cunoaștere avansată a acestei structuri, cu reflexe certe în explicarea unor procese patologice la nivel molecular. Este posibilă o autentică microdisecție a scheletului membranei eritrocitare. După îndepărtarea membranei plasmatice a hematiei cu detergenți, forma celulei nu se modifică, deoarece citoscheletul se păstrează. Dimpotrivă, la tratarea cu soluții de forță ionică mică, prin dezorganizarea citoscheletului celula se fragmentează în vezicule mici. Operațional, scheletul membranei este definit ca reziduul insolubil care rămîne după extracția cu detergentul neionic Triton-X-100. Prima observație clară a scheletului membranei eritrocitare a fost efectuată de către J. Yu și colab. (354), care au afirmat că detergentul utilizat solubilizează aproape toate lipidele și proteinele integrale din membrană. Reticulul obținut, care păstrează forma hematiei, conține circa 76% spectrină, 5% actină, 5% proteine din banda 4.1 și proporții variabile din benzile 3, 4.2 și 4.9 în raport cu condițiile de extracție. Rețeaua citoscheletică obținută astfel, denumită *„Triton Shells"* de către autorii americani, a putut fi fotografiată și apare ca o rețea cu ochiuri inegale, legate unele de altele prin noduri.

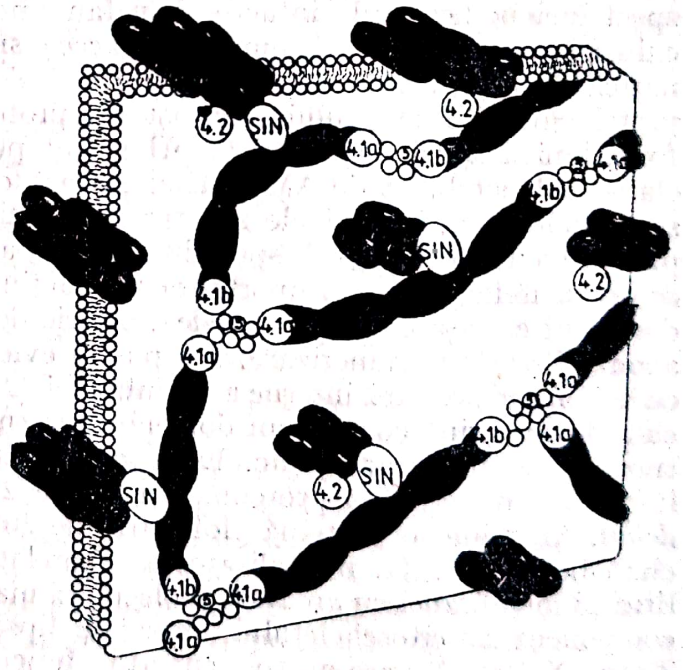


Fig. VII. 13 — Dispunerea moleculelor componente ale citoscheletului pe fața internă a membranei eritrocitare. Sînt figurate lanțurile fibrilare de spectrină, moleculele de legătură ale acestora, iar transmembranar, proteina banda 3 (După G. Guidotti, 1986) (137).

Scheletul membranei comportă 4 proteine majore: spectrina, actina, proteina 4.1 și proteina 4.9. El este ancorat la membrană prin ankirină, care unește spectrina aproape de capătul fiecărui heterodimer la proteina de transport al anionilor (banda 3). Un al doilea contact membrană-schelet membranar pare să se producă între glicoconectină — o sialoglicoproteină transmembranară minoră — și proteina 4.1, dar semnificația acestui contact rămîne să fie elucidată (fig. 13).

Scanned with OKEN Scanner

Molecula de bază a rețelei, *spectrina* este un heterodimer cu greutatea moleculară de 460 000 daltoni, alcătuit dintr-un lanț α de 240 000 și un lanț β de 220 000 daltoni. Aceste lanțuri fibrilare, mai mult ori mai puțin înfășurate între ele, contractează legături disulfurice, disociabile prin uree și dodecil-sulfat de sodiu (SDS), iar domeniile lor funcționale încep să fie bine cunoscute. Spectrina poate fi extrasă din membrane sub două forme, dimerică sau tetramerică, după condițiile fizico-chimice de extracție. Aceste două forme sînt *in vitro* și, probabil, *in vivo* în echilibru termodinamic, funcție de temperatură și forța ionică a mediului (254). La microscopul electronic, prin colorație negativă, dimerul αβ apare elongat, flexibil, cu o lungime a conturului de 97 nm, iar tetramerul are o lungime exact dublă, de 194 nm. Structuri mai complexe decît tetramerii apar la concentrații de spectrină de circa 5 mg/ml (217). În membrană echilibrul este în favoarea tetramerului care poate fi considerat, de aceea, forma fiziologică a spectrinei. Atît dimerii cît și tetramerii sînt foarte flexibili. Deoarece *in vitro* au fost obținuți polimeri de spectrină, la concentrații ridicate ale acesteia, nu este exclusă existența *in vivo* a polimerilor, condiții de concentrație identice existînd la nivelul ochiurilor rețelei. Este importantă constatarea că interacțiunile *in vivo* între moleculele de spectrină nu implică existența unei proteine complementare, ele depinzînd doar de factori biofizici (195). În interacțiunea dimer-dimer intervin atît lanțul α cît și lanțul β. Totuși, situsurile de interacțiune necovalentă ar putea fi supuse la un control alosteric prin intermediul altor proteine, prin ionii fosfat anorganici sau printr-o fosforilare covalentă. Fosforilarea spectrinei în hematiile intacte și în fantome pare dependentă de o cazeinchinază membranară, denumită de aceea spectrinchinază. Activitatea chinazică dependentă de AMP-ciclic are un rol foarte redus în autofosforilarea proteinelor citoscheletului. Dimpotrivă, proteinele citoscheletului extrase la forță ionică slabă, la 4°C și la pH 9 sînt puternic fosforilate de o proteinchinază dependentă de AMP-ciclic, extrasă concomitent. Fosforilarea interesează cele două lanțuri ale spectrinei și actina. Fapt inexplicabil, ea nu se produce cînd complexul spectrină-actină-banda 4.1 este complet, nici pe componentele izolate. Importanța interacțiunii între dimerii spectrinei ține de faptul că, așa cum se va vedea, o serie de stări patologice sînt consecința anomaliilor de tetramerizare. S-a pus în evidență o interacțiune a spectrinei cu fosfolipidele fetei interne a membranei (236), datorată faptului că molecula de spectrină conține un domeniu puternic hidrofob, susceptibil să penetreze în dublul strat lipidic. Este, însă, mult mai caracteristică atașarea sa la membrană printr-o proteină din banda 2.1, denumită *ankirină* sau *sindeină*. Ankirina, o proteină globulară, de 200 000 daltoni, a fost inițial asociată benzii 2.1, dar în realitate pare corelată cu o serie de produși proteolitici ai membranei cu greutate moleculară mai redusă. Ea nu este considerată component al citoscheletului, deoarece lipsește după izolarea acestuia cu Triton-X-100, dar are un rol central în funcția scheletului membranei eritrocitare. Ankirina este ea însăși legată cu membrana prin banda 3, proteină majoră transmembranară a eritrocitului. Astfel, interacțiunile spectrină-ankirină-banda 3 ancorează citoscheletul la nivelul membranei. Există în fiecare celulă circa 100 000 molecule de ankirină, iar în soluție ea formează cu spectrina un complex cu o stoichiometrie de o moleculă de ankirină pentru un heterodimer de spectrină. Cum dimerii de spectrină sînt prezenți în fie-

Scanned with OKEN Scanner

care eritrocit în număr de circa 200 000, devine probabil, ca la nivelul membranei, un tetramer $\alpha_2\beta_2$ să fie asociat unei molecule de ankirină (22). Relația ankirină-metabolism eritrocitar este incertă și se presupune că ea ar interveni în modificările de formă ale hematiei, induse prin depleția de ATP (22). Ankirina nu este specifică globulului roșu, proteine comparabile antigenic au fost decelate în microtubulii altor celule, ele avînd, probabil, o funcție de legătură comparabilă cu a ankirinei.

Detaliile moleculare ale asocierii ankirină-banda 3 sînt încă necunoscute. Există circa 10^6 copii ale benzii 3 pentru fiecare celulă, la nivelul cărora ar exista circa 100 000—125 000 locuri de legătură pentru ankirină. Cum banda 3 se află la nivelul membranei sub forma unui tetramer, se poate presupune că există un loc de legătură pentru ankirină la fiecare 2—2,5 tetrameri.

A doua componentă a citoscheletului eritrocitar, *actina*, cu greutate moleculară de 42 000 daltoni, a fost denumită inițial banda 5. Ea formează microfilamente de 5 nm diametru și de cîțiva micrometri lungime și pare a avea proprietăți similare cu actina din mușchiul striat. Totuși, capacitatea sa de activare a ATP-azei asociate membranei este mai mare decît în cazul actinei musculare (70). Se admite că actina globulului roșu face parte din β-actine și se află sub forma unor protofilamente constituite dintr-un număr limitat de monomeri.

Recent s-a demonstrat că actina se află în citoschelet sub forma F, compusă din 30 de monomeri, alcătuind un lanț dublu elicoidal de cîte 15 monomeri (13). În acest caz filamentele sînt scurte, de circa 25 nm lungime și dificil de detectat la examenul microscopic. Dimpotrivă, au fost extrase din „fantomele" eritrocitare, după stabilizare cu faloidînă, filamente care pot conține 30—60 monomeri, cu o lungime de peste 100 nm, comparabilă cu cea a spectrinei.

Al treilea component al rețelei, *banda 4.1* este o proteină cu greutatea moleculară între 78 000 și 82 000 daltoni. Proteina apare ca o bandă unică la electroforeza în gel de poliacrilamidă-SDS, alteori (electroforeză în gel) dedublîndu-se în benzile 4.1 a și 4.1 b, de 80 000 și 78 000 daltoni. Semnificația acestei dedublări este incertă, cele două componente fiind fosfoproteine cu structură moleculară foarte apropiată. Diferența de masă moleculară s-ar putea explica fie printr-o analogie genetică ce determină două proteine foarte asemănătoare, ori printr-o proteoliză parțială, din fracțiunea 4.1 a rezultînd 4.1 b. Este posibilă și o modificare produsă după sinteza proteinelor. Formele 4.1 a și 4.1 b se fixează la spectrină, dar nu se știe dacă interacțiunile moleculare sînt identice pentru fiecare component. După unii autori, raportul cantitativ 4.1 a/4.1 b ar depinde de vîrsta globulelor roșii, cantitatea relativă a fracțiunii 4.1 a crescînd progresiv pe măsura îmbătrînirii hematiilor, pentru o sumă 4.1 a + 4.1 b constantă. S-a afirmat că dacă cele două fracțiuni ar avea interacțiuni diferite cu proteinele citoscheletului, modificările observate în cursul îmbătrînirii ar putea fi responsabile de o diminuare a deformabilității globulului roșu (162). În anumite condiții, banda 4.1 poate forma agregate multimerice în soluție, dar nu se știe dacă aceste agregate există în citoschelet (162).

O altă componentă *banda 4.9* este adesea ignorată, lipsind din descrierea scheletului membranei eritrocitare. Avînd 48 000 daltoni, se pare că se află în concentrație echimoleculară cu tetramerii de spectrină. Datele referitoare la funcția acestei proteine sînt reduse, dar ea poate fi implicată în

Scanned with OKEN Scanner

menținerea structurii citoscheletului, probabil, prin reducerea ratei de polimerizare a actinei și prin stabilizarea oligomerilor de actină (162).

Dacă descrierea componentelor izolate ale citoscheletului eritrocitar este foarte avansată, vizualizarea microscopică a structurii rămîne dificilă. Lucrări recente rezultate din examinarea secțiunilor fine ale membranelor, fixate cu acid tanic-glutaraldehidă furnizează detalii asupra citoscheletului eritrocitar *in situ* (133). Astfel, pe secțiuni oblice ale membranei se observă ochiuri de rețea delimitate de filamente cu 9 nm diametru, distribuite omogen, deși dezorganizate. Rețeaua este conectată cu noduri de 25 nm (fig. 14).

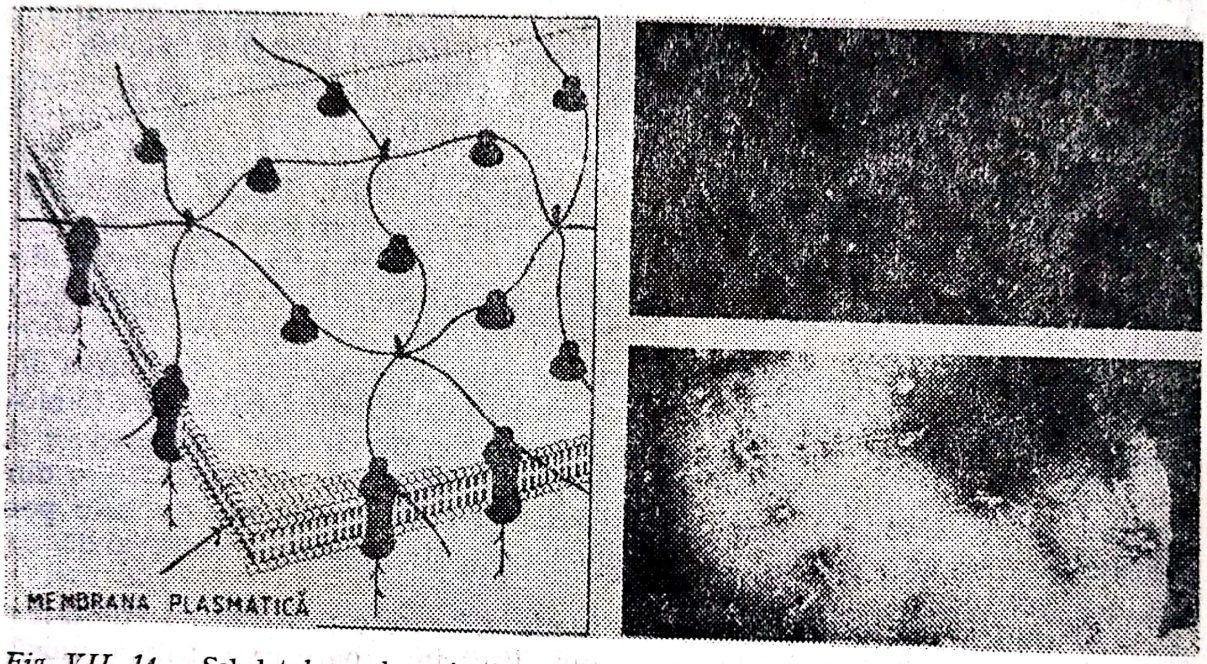


Fig. VII. 14 — Scheletul membranei eritrocitare: a) *în stînga*, reprezentare schematică a rețelei de actină și spectrină a membranei eritrocitare, pe schemă se observă fragmente scurte de actină formînd nodurile rețelei; ele sînt legate prin molecule fine de spectrină (cerculețe în negru mai deschis), care la rîndul său atașează rețeaua la proteina din banda 3, ce străbate integral membrana ; b) în *dreapta sus*, micrografie electronică, în care se observă forma alungită a unei proteine purificate asemănătoare spectrinei; c) *în dreapta jos* micrografie electronică în care pot fi reperate legăturile de spectrină, locurile de legătură ale ankirinei și lanțurile de actină. (După D. Branton și colab., 1981) (45).

Pe secțiuni, la nivelul stratului bilipidic apare o rețea densă de particule granulare avînd 10—13 nm diametru, estimate la 270 000 pentru fiecare celulă. Nodurile de 25 nm diametru au fost observate și în mixturile de spectrină-actină și banda 4.1. Imaginile cele mai apropiate de realitate au fost obținute prin criofractură după congelare rapidă (294).

Observațiile biochimice și ultrastructurale permit reprezentarea schematică a citoscheletului eritrocitar. Acesta poate fi considerat alcătuit dintr-o serie de „unități celulare". O unitate conține în centrul său molecule de actină, care formează protofilamente alcătuite din 5 pînă la 30 de monomeri. „Miezul" din actină poate fi stabilizat prin ascociere cu spectrina, banda 4.1 și, probabil, cu banda 4.9 (294). La protofilamentul de actină se asociază 2 pînă la 12 dimeri de spectrină, în asociere cu molecule din banda 4.1 (una pentru fiecare dimer) și cu banda 4.9 (una pentru doi dimeri). Unitățile astfel alcătuite se pot organiza bidimensional prin asocierea dimerilor cu cei simi-

Scanned with OKEN Scanner

lari din unitățile subiacente, formînd tetrameri. Rețeaua este legată cu membrana prin asocierea spectrinei cu ankirina, posibil împreună cu banda 4.1. Organizarea scheletului membranei este influențată de o serie de proteine, care țintesc îndeosebi interacțiunea citoschelet-membrană. Este cazul proteinei din banda 4.2, hemoglobinei, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazei (banda 6) și al altor enzime. Recent s-a arătat că polifosfații de tip 2,3-difosfoglicerat și ATP la concentrații de 2,5 mmol/litru și, respectiv, 8 mmol/litru afectează asocierea proteinelor citoscheletului între ele și cu membrana.

Funcțional, citoscheletul reprezintă un element major al stabilității, formei și flexibilității membranei eritrocitare. O hematie parcurge în cele 120 zile de viață mai multe sute de kilometri, deformabilitatea fiind una din condițiile oxigenării tisulare. Speciile animale cu eritrocite mai puțin deformabile (capre, oi) prezintă capilare mai mari. Disparitatea diametru eritrocitar/diametru capilar și deformabilitatea pe care ea o impune, în mod particular la om, ar putea juca un rol nu numai în facilitarea transportului oxigenului și al dioxidului de carbon, dar și în transportul apei din spațiile interstițiale spre sînge (187). Globulul roșu se comportă, datorită flexibilității sale, ca o picătură de lichid într-un lichid, grație acestui fapt se menține fluiditatea sîngelui evitîndu-se perturbările fluxului sanguin. S-a demonstrat experimental că dacă eritrocitele ar fi particule sferice și rigide sîngele ar lua consistența asfaltului. Cu ajutorul particulelor de latex fixate la suprafața externă a membranei, sau cu corpusculi Heinz legați pe fața internă, s-a probat că în cursul antrenării hematiei în fluxul sanguin membrana eritrocitară se rotește în jurul interiorului celular (citosolului) asemenea șenilelor unui tanc (fig. 15). Membrana eritrocitelor de om, și de mamifer în general, prezintă o serie de proprietăți „neconvenționale", reacționînd atît ca un solid cînd se destinde elastic, cît și ca un fluid viscos, dovedind o complianță extremă la forțele externe. Recent a devenit clar că forma particulară a eritrocitului este de cauze exclusiv membranare. Concluzia a fost obținută prin utilizarea „reoscopului", care permite observarea la microscop a deformării continue a hematiilor supuse unor forțe de deformare comparabile cu cele fiziologice din organism (fig. 16).

Numeroase studii recente sugerează că spectrina reprezintă suportul molecular determinant al proprietăților mecanice și al formei stabile eritrocitare, prin formarea rețelei macromoleculare la nivelul suprafeței citoplasmatice a dublului strat lipidic (27, 45, 70, 129, 133). Astfel, recent s-a demonstrat că spectrina pură, în absența oricărei alte proteine, este capabilă concentrații mari să se organizeze sub formă înalt polimerizată, într-o rețea constituită exclusiv din această proteină. Dacă se ține seama că dimerul de spectrină are o lungime de 100 nm, cu o secțiune circulară de același diametru, cele 240 000 copii ale dimerului, dispuse în monbstrat în fiecare eritrocit, acoperă o arie de aproximativ 64 μm^2. Aceasta reprezintă circa 45% din întreaga arie a globulului roșu, de aproximativ 140 μm^2. Moleculele de spectrină sînt ionizabile, cu un punct izoelectric la pH 4,8 (95). Probe obținute prin rezonanță electronică de spin nu au relevat că imobilizarea moleculelor de spectrină în cadrul rețelei ar rezulta din legarea spectrinei la membrană (202). Recent au fost măsurate și proprietățile elastice ale rețelei tridimensionale de spectrină (274, 312, 313). Analiza datelor obținute conduce la concluzia că explicarea componentei elastice a spectrinei din rețea poate fi abordată prin teoria elastomerilor. De aici ideea, susținută îndeosebi de

Scanned with OKEN Scanner

B. T. Stokke și colab., că scheletul membranei eritrocitare ar putea fi un gel ionic. Cele două straturi lipidice și gelul ionic proteic sînt libere să alunece unul față de altul în planul membranei. Densitatea de distribuție a gelului nu este uniformă, de unde rezultă forma caracteristică a celulei. Grupul amintit a elaborat, pornind de la teoria generală a proprietăților mecano-chimice și a energiei elastice libere, un nou model al membranei celulare, denumit modelul gel proteic — dublu strat lipidic. Acest model ar oferi baze teoretice și moleculare coerente pentru explicarea proprietăților mecano-chimice ale eritrocitului (312, 313).

În fig. 17 este prezentat modelul respectiv. Moleculele celor două straturi lipidice, extracelular (E) și protoplasmatic (P) se află în stare fluidă. Fiecare jumătate a dublului strat are grosimea b. Scheletul membranei (SM) se comportă ca un gel ionic (elastomer ionic umflat). Distanța între mijlocul scheletului membranei (MSM) și suprafața citoplasmatică a stratului bili-

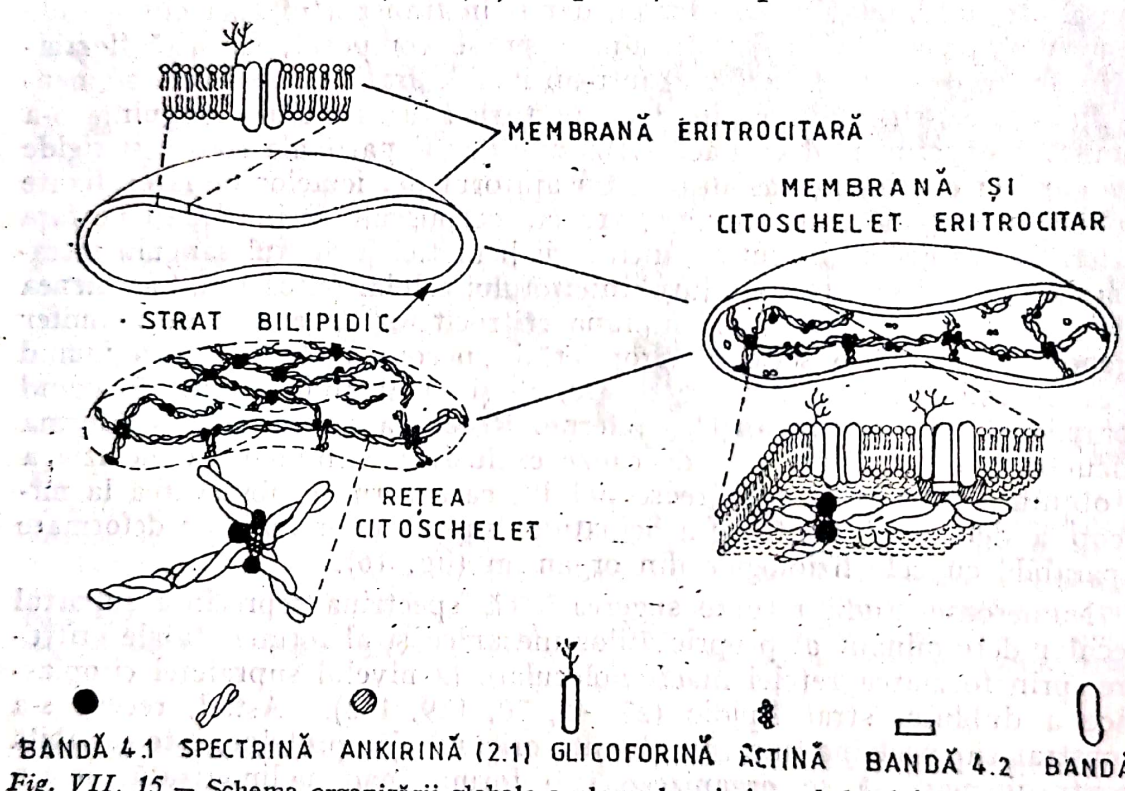


Fig. VII. 15 — Schema organizării globale a plasmalemei și a scheletului membranei eritrocitare, conform datelor actuale.

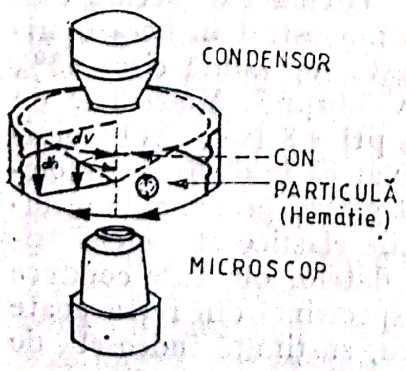


Fig. VII. 16 — Alcătuirea reoscopului: un con transparent (schițat în linii discontinue) care se află în contrarotație cu un platou transparent, cele două componente fiind mobilizate de un ax comun. Prin acest procedeu, particulele suspendate în fluid, între con și platou suportă o mișcare rotațională, rămînînd accesibile observatorului.

pidic este a. Coordonata Z reprezintă distanța de la MSM și este pozitivă pentru punctele localizate pe fața citoplasmatică și negativă pentru punctele de pe fața opusă. Proteinele integrale ale membranei (PIM) pot, sau nu, să fie legate la scheletul membranei. Cele două jumătăți ale dublului strat lipidic și scheletul membranei sînt libere să se miște unul față de altul în planul membranei celulare. Scheletul membranei poate suferi modificări de distribuție a densității, modificîndu-se astfel forma hematiei (312, 313).

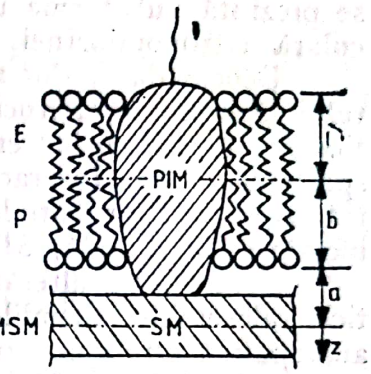


Fig. VII. 17 — O nouă reprezentare a membranei eritrocitare: modelul gel proteic — strat dublu lipidic. (După B. T. Stokke și colab., 1986) (312, 313).

Precizarea rolului de prim ordin al spectrinei în determinismul citoscheletului eritrocitar beneficiază de un model experimental ideal: șoarecii cu deficiență genetică de spectrină. Cu ajutorul reoscopului, menționat anterior, au fost observate forma și deformabilitatea eritrocitelor provenind de a animalele deficiente în spectrină, *in vitro* (proaspete și după fixare) și *in vivo* (microscopie intravitală pe capilarele mezenterice). Contrar previziunilor, sferocitele — expresie a pierderii ireversibile a formei eritrocitare — sînt excepțional de rare, în schimb, se detectează sfero-echinocite, microvezicule eritrocitare, figuri mielinice, iar ocazional stomato-sferocite. Acest pleiomorfism a fost observat și la microscopia electronică cu baleiaj și exprimă tendința membranei către o curbatură în exterior, inversă formei normale. Pe de altă parte, se demonstrează că deficiența în spectrină nu poate conduce singură la sferocitoză, o serie de evaginații ale membranei putînd fi readuse în corpul celular prin forțe mecanice moderate. Modificările produse sînt interpretate drept consecința unui exces al ariei suprafeței hematiei. Date recente (1986) probează că după acțiunea unor enzime ca neuroaminidaza, tripsina, chemotripsina, care produc un clivaj al reziduurilor de acid sialic de la nivelul suprafeței celulare, tendința la curbatură pozitivă a membranei dispare și nu se mai observă nici o protuberanță. Totodată, cînd membranele desializate sînt ușor deformate (elongate) ele nu mai revin după încetarea forțelor deformante la configurația normală, prezentînd o pierdere certă a elasticității (280). Din aceste observații rezultă că spectrina (acționînd pe interfața internă între membrană și citoplasmă) și reziduurile de acid (acționînd la nivelul interfeței externe între membrană și plasma sanguină) exercită un efect antagonist asupra curbaturii membranei și a elasticității de revenire după îndoirea acesteia. Reziduurile de acid sialic, puternic încărcate și situate pe fața externă a celulei, produc curbatura pozitivă a membranei. Această observație poate fi explicată ușor considerînd că efectul mecanic este datorat forțelor coulombiene de repulsie, care expandează jumătatea exterioară a stratului dublu lipidic. Se conturează astfel un nou model prin intermediul căruia se oferă o explicare globală a comportării elastice probată

Scanned with OKEN Scanner

de eritrocitul normal de om și mamifer, bazată pe interacțiunea elastică a proteinelor cuplată cu stratul bilipidic al membranei.

Se observă că după o etapă de analiză a componentelor, actualmente interesul se concentrează frecvent către precizarea interacțiunilor dintre moleculele componente, dar nici etapa analizei moleculare nu poate fi considerată încheiată. De exemplu, recent s-a raportat izolarea unei noi proteine a scheletului membranei, tropomiozina. Proteina extrasă, de 30 000 daltoni, se prezintă sub forma nativă ca dimer și ar putea constitui forma nemusculară a tropomiozinei (108).

Deocamdată, sînt recunoscute cel puțin 5 funcții principale ale scheletului membranei eritrocitare: a) *Prezervarea formei*. Proprietățile viscoelastice ale membranelor eritrocitare sînt determinate în principal de rețeaua spectrină-actină. Interacțiunile dintre aceste proteine au o afinitate moderată și pot fi suprimate la un stres moderat de forfecare, refăcîndu-se la finele încetării forței (236, 312, 313).

Diversitatea alterărilor formei în diverse boli ca: anemiile megaloblastice, talasemiile, anemiile feriprive, mielofibrozele, anemia hemolitică microangiopatică este consecința modificărilor asamblării proteinelor componente ale scheletului membranei.

b) *Stabilitatea membranei:* După extracția spectrinei, eritrocitul se fragmentează. Stabilitatea membranei în cursul deformărilor extreme nu se menține decît dacă zona internă a membranei interacționează cu citoscheletul într-un număr suficient de puncte. Numai astfel se poate împiedica producerea de microvezicule eritrocitare (98).

c) *Deformarea membranei*. Deformabilitatea hematiei scade cînd sînt produse experimental procese de legare încrucișată între proteinele citoscheletului (207).

d) *Controlul mobilității laterale a proteinelor integrale*. Difuziunea laterală a acestor proteine este mult diminuată de către citoschelet (106). Nu este necesară o atașare directă la citoschelet, mișcările părții interne a proteinelor intrinseci fiind obstrucționate prin însăși existența rețelei. În acest sens, s-a demonstrat că substanțele care provoacă disocierea citoscheletului redau proteinelor intrinseci mobilitatea laterală (236). Agregarea spectrinei antrenează, deopotrivă, agregarea proteinelor benzii 3 sub forma unor particule membranare net vizibile la microscopul electronic, după criofractura în vid (237). Restricția introdusă de scheletul membranei asupra mobilității benzii 3 și a glicoforinelor ar permite menținerea omogenității distribuției sarcinilor negative de la suprafața globulului roșu.

e) *Stabilizarea stratului dublu lipidic*. Proteinele citoscheletului sînt legate cu lipidele membranare. Astfel, între spectrină și fosfolipidele fetei interne lipidice, în particular fosfatidilserina, se creează o legătură de tip hidrofob. Experiențe efectuate pe lipozomi au arătat că legarea spectrinei este facilitată în cazul cînd membrana acestora este alcătuită dintr-un amestec de fosfatidilserină și fosfatidiletanolamină (236). Această legare a spectrinei cu aminofosfolipidele ar fi direct responsabilă de menținerea asimetriei lipidice în cele două straturi de lipide ale membranei. Un argument important îl constituie pierderea asimetriei după extracția sau alterarea spectrinei.

În ansamblu, interacțiunile între proteine și domeniul intrinsec proteine-lipide au ca rezultat: a) distribuirea laterală omogenă a lipidelor și proteinelor

Scanned with OKEN Scanner

intrinseci, realizîndu-se astfel deplasările importante și fuziunea; b) stabilizarea celulei în timpul deformărilor extreme pe care aceasta le suportă în circulație.

Deși scheletul membranei are un loc privilegiat în determinarea formei hematiei și a deformabilității sale, rolul său nu este exclusiv. Ne propunem să examinăm acest aspect într-o secțiune următoare.

3. ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A MEMBRANEI ERITROCITARE

Chiar dacă în domeniul compoziției moleculare membrana eritrocitară este mult mai bine cunoscută în raport cu celelalte membrane celulare, imaginea sa tridimensională rămîne, deocamdată, în mare măsură ipotetică. Totuși, chiar în aceste condiții, arhitectura membranei beneficiază de o serie de reprezentări globale.

La microscopia electronică prin transmisie, efectuată după fixare și secțiune, membrana hematiei apare sub clasica formă trilaminară cu grosimea de aproximativ 7 nm (329). Se știe că această imagine este simplificatoare, dar ea reprezintă totuși prima probă morfologică a existenței membranei. Ocazional s-a observat pe micrografii și o structură fibrilară asociată (fig. 18), demonstrată recent ca fiind alcătuită din glicoproteine (342, 343).

Punerea la punct a tehnicilor de preparare a membranelor prin crifractură în vid a deschis posibilitatea redării structurii moleculare a interiorului membranei (44, 81). Întrucît utilizînd această tehnică am obținut o serie de rezultate (267, 269), prezentăm succint experiența noastră în acest domeniu. Instalația utilizată pentru criofractură (tip BAF 300 Balzers) este alcătuită, în principal, dintr-o incintă (un clopot) în care se realizează criofractura și sublimarea la presiune redusă, o platină refrigeratoare, un microtom, un tun electronic pentru obținerea replicilor, echipament optic pentru observarea incintei, pompe de vid înalt, precum și dispozitive conexe pentru comanda sistemelor enumerate (fig. 19).

Tehnica de lucru pe care am utilizat-o a fost pe scurt următoarea: recoltarea sîngelui s-a efectuat cu anticoagulante, în eprubete din sticlă siliconată, pentru evitarea „efectului sticlă", constînd în apariția de spiculi la nivelul hematiilor prin contactul direct cu sticla. După centrifugare și spălare în mediu izotonic NaCl—TRIS, eritrocitele sînt suspendate într-un mediu tampon-fosfat Sörensen-glicerol. Glicerolul are rolul de agent crioprotector, prevenind formarea unor cristale de gheață accentuate intra- și extracelular.

O diluție de 1/50 din sîngele total a asigurat o densitate acceptabilă a numărului de eritrocite.

În continuare, timpii de lucru sînt următorii (fig. 20): a) se depune cu o pipetă Pasteur siliconată o picătură din amestecul hematii-mediu crioprotector, pe un portobiect alcătuit din platină; b) portobiectul este plonjat apoi într-un mic rezervor cu freon 22 amplasat la porțiunea superioară a unui vas Dewar; c) se introduce apoi foarte rapid portobiectul în azotul lichid conținut în vas; d) urmează transferul extrem de rapid (sub o secundă)

Scanned with OKEN Scanner

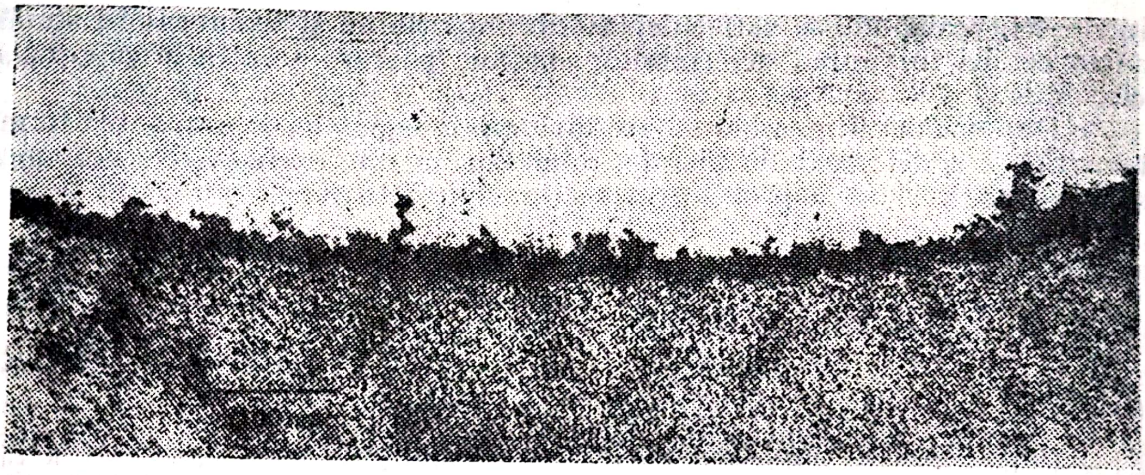


Fig. VII. 18 — Micrografie electronică obținută pe o secțiune a membranei eritrocitare „colorată" cu material electronodens (roșu de rutenin și tetraoxid de osmiu). Stratul foarte dens „colorat" este expresia componentelor glucidice ale glicoproteinelor din membrană (După R. Harrison și G. G. Lunt, 1980) (28).

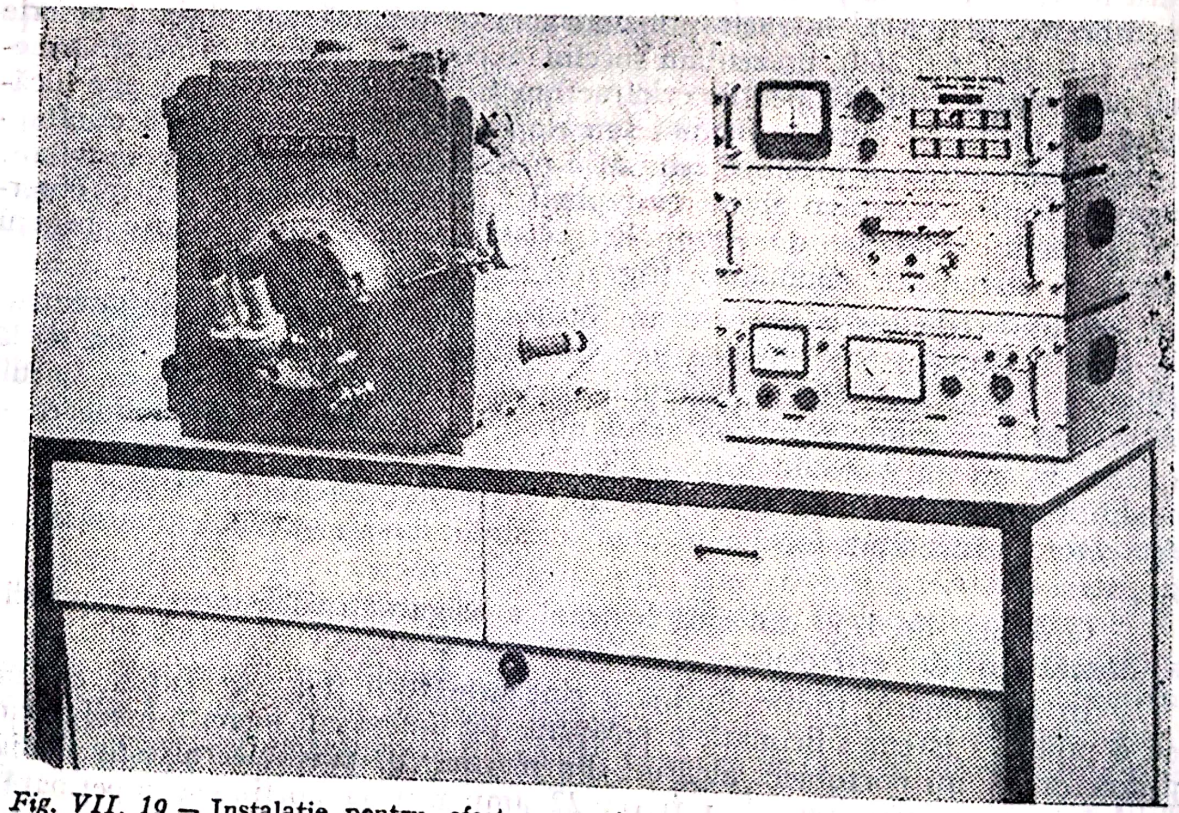


Fig. VII. 19 — Instalație pentru efectuarea criodecapajului (criofracturii) de tip Balzers BAF 300 utilizată de autori (Laboratorul de Biofizică, Facultatea de Medicină Créteil, Universitatea Paris XII).

Scanned with OKEN Scanner

al probelor la nivelul platinei refrigeratoare, care conține 4 depresiuni pentru porteșantioane, ceea ce permite prepararea concomitentă a unui număr egal de probe; e) concomitent cu probele este pregătit și sistemul de criofractură (funcționare a pompei de difuzie 30 de minute, preparare, fixare și centrare a electrozilor platină-carbon, răcire la — 100°C a platinei); f) apoi probele

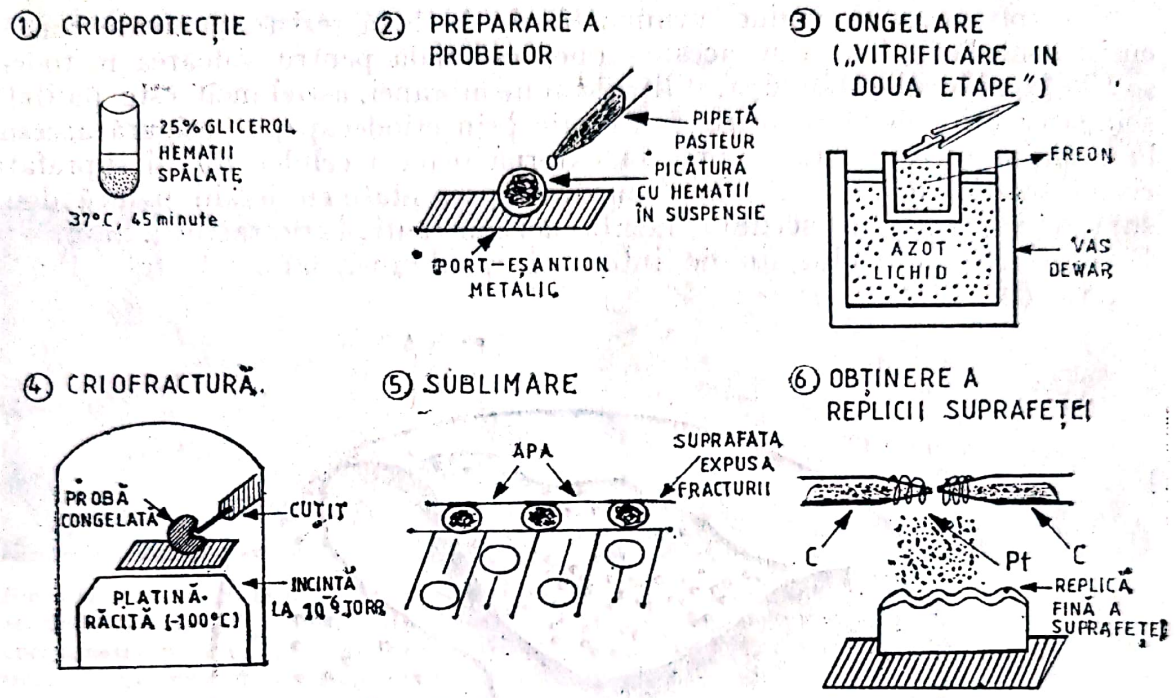


Fig. VII. 20 — **Etapele preparării eritrocitelor prin metoda criofracturii. În final se obține o replică fină a suprafeței expusă fracturii, care va fi examinată la microscopul electronic cu transmisie.**

congelate în azot lichid (— 196°C) sînt transferate extrem de rapid (sub o secundă) pe platină; g) se închide ermetic incinta și se pun în funcțiune pompele de vid, pînă la obținerea unei depresiuni de cel puțin 2×10^{-6} Torr, concomitent se va răci lama microtomului la — 100°C; h) urmează fracturarea probelor congelate cu microtomul, care va îndepărta straturi superficiale ale eșantioanelor și va descoperi o suprafață de fractură; hematiile fiind congelate, cel mai frecvent se va produce o rupere a acestora, urmînd liniile de slabă rezistență create prin temperatura scăzută; i) concomitent cu fracturările repetate ale membranelor eritrocitare, pe suprafețele nou create există și cristale de gheață care vor sublima *(etching)* datorită presiunii extrem de reduse; este un timp esențial, fiindcă elimină principala sursă de artefacte; j) deoarece structurile criofracturate nu pot fi examinate ca atare la microscopul electronic din cauza grosimii și rezistenței reduse, în final se realizează prin evaporare cu ajutorul unor electrozi sau a unui tun electronic o replică fină a suprafeței, fără structură proprie și foarte contrastantă, în cazul nostru din platină-carbon; k) urmează devidarea incintei, apoi imersia celor 4 portprobe în apă distilată pură, cu care ocazie replicile se separă instantaneu; în continuare acestea sînt transferate cu ajutorul unei bucle fine din platină într-un mediu de digestie (de exemplu apă Javel) a fragmentelor

Scanned with OKEN Scanner

organice rămase accidental; l) după 2 ore replicile se spală în apă bidistilată, apoi se transferă pe grile electrostatice în vederea examinării prin microscopie electronică.

Alternativ, am utilizat un dispozitiv ce permite obținerea a două replici complementare, pozitivă și negativă. Am preferat însă, din motive de calitate a replicilor, metoda „clasică".

Criofractura se produce urmînd zonele de slabă rezistență create consecutiv congelării. Una din aceste zone, esențială pentru valoarea metodei, se află la mijlocul dublului strat lipidic al membranei, astfel încît este posibilă scindarea celor două straturi. Schematic prin criodecapaj se asigură accesul la examinarea a 4 zone: suprafața externă reală a celulei (D) și suprafața citoplasmatică (C), care în figură nu sînt reprezentate cu detalii și încă două suprafețe ce corespund sciziunii membranei consecutivă criofracturii. Suprafața B corespunde stratului lipidic intern al membranei, iar A stratului lipidic extern (fig. 21).

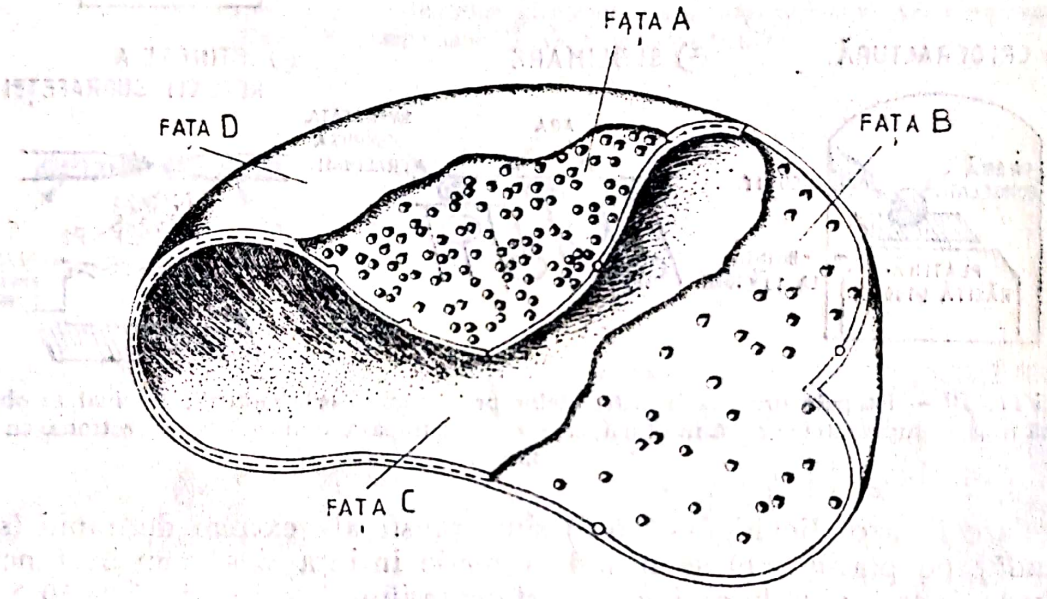


Fig. VII. 21 — Diagrama celor 4 „fețe" eritrocitare ce pot fi examinate prin criofractură: 1) fața A, constituită din monostratul lipidic extern (în prezent, notată convențional cu E). 2) fața B, constituită din monostratul lipidic intern (notată convențional cu P). Ambele conțin proteine dezvăluite cu criofractură sub forma unor „particule asociate membranei" (MAP). Fețele C (juxtacitoplasmatică) și D (suprafața exterioară reală a hematiei) nu conțin particule și nu prezintă interes, decît pentru detectarea unor eventuale artefacte (gheață, particule de carbon).

La nivelul fețelor corespunzătoare foițelor lipidice se constată prezența unei populații de particule mici, cu diametrul de 7—10 nm, în număr mai mare la nivelul foiței externe lipidice.

Reprezentarea schematică din figura 21 poate fi ilustrată perfect prin imagini de microscopie electronică. Astfel, în figurile 22 și 23 se observă micrografiile electronice ale unei replici obținute pe hematia de om (pentru explicații a se vedea legenda figurilor).

Pentru interpretarea corectă a semnificației „particulelor asociate membranei" (denumire dată după descoperirea lor) au fost efectuate cercetări

Scanned with OKEN Scanner

numeroase. La început s-a crezut că aparţin exclusiv feţei externe a membranei (222, 343). Ulterior s-a demonstrat că fracturarea produce separarea în două jumătăţi la nivelul interfeţei celor două straturi monolipidice componente ale membranei (44, 254, 343).

Concluziile generale ale acestor studii sînt următoarele: a) faţa externă a membranei, în contact cu mediul de suspensie, este relativ netedă; b) planul de fractură produs la interfaţa externă a stratului dublu lipidic conţine

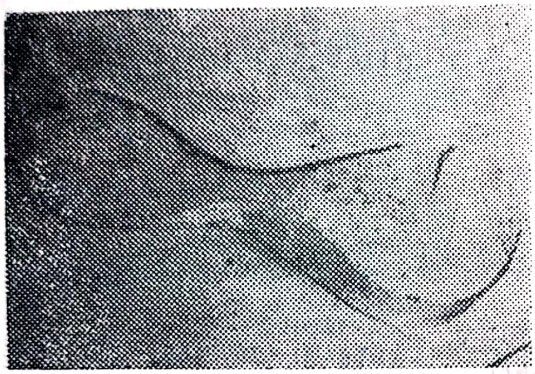


Fig. VII. 22 — Micrografie electronică reprezentînd o fractură produsă prin hazard, aproximativ pe direcţia diametrului eritrocitar. La nivelul jumătăţii inferioare a imaginii linia de fractură trece la suprafaţa externă a monostratului lipidic extern (v. fig. 23). (Clişeu efectuat în Laboratorul de Biofizică al Facultăţii de Medicină Créteil, Universitatea Paris XII).

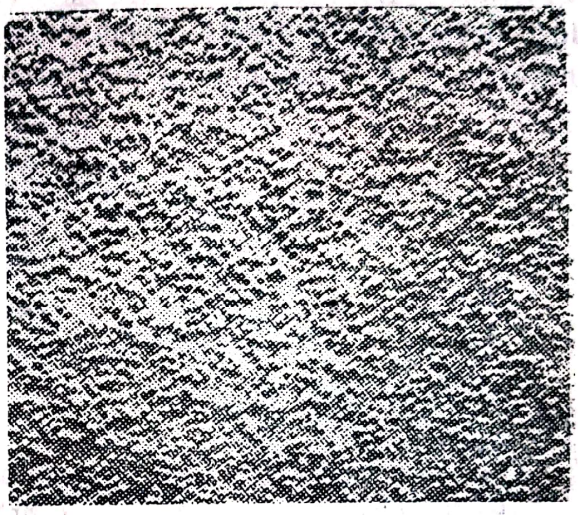


Fig. VII. 23 — Imagine a feţei E (corespunzătoare monostratului lipidic extern) obţinută prin microscopie electronică după criofractura membranei eritrocitare. Se observă densitatea mare de particule intramembranare aparţinînd proteinelor (Clişeu efectuat în Laboratorul de Biofizică al Facultăţii de Medicină Créteil, Universitatea Paris XII).

o serie de particule; c) planul intern prin fractura de la limita celor două straturi lipidice conţine de circa 4—5 ori mai multe particule decît cel extern; d) suprafaţa citoplasmatică prezintă frecvent fibrile subţiri extinse de la nivelul membranei către interiorul celulei.

Particulele asociate membranei au fost corelate cu prezenţa proteinelor, această supoziţie reprezentînd unul din factorii care au generat ideea structurării membranei sub forma unui mozaic fluid lipido-protidic (44, 297). Diferenţa numărului de particule de la nivelul celor două monostraturi lipidice a pus în evidenţă asimetria structurală din interiorul membranei (343). Faptul că digestia proteolitică a membranelor reduce numărul de particule asociate, a întărit asumpţia naturii proteice a particulelor (212). Dacă în mod normal, particulele sînt distribuite mai mult sau mai puţin dezordonat, în anumite condiţii ele prezintă tendinţa de aglomerare în planul membranei. Aglomerări similare au fost constatate şi după digestia proteolitică. Migraţia particulelor cu formarea consecutivă de agregate este un fapt experimental de importanţă crucială în demonstrarea fluidităţii membranei (247, 314).

Fenomenele menţionate anterior au fost demonstrate cu claritate pe micrografiile electronice ale membranei globulului roşu, obţinute după criofractură. Astfel, la pH 7,5 particulele intramembranare sînt dispersate (fig. 24).

Scanned with OKEN Scanner

Incubarea fantomelor într-un mediu cu pH 5,5 provoacă o reunire a particulelor în agregate. Procesul este reversibil, prin reincubare la pH 7,5 particulele se dispersează din nou. Se probează, deci, că particulele intramembranare, care corespund proteinelor integrale, sînt mobile în dublul strat lipidic (29, 247).

Un experiment analog, de astă dată prin microscopie electronică clasică, constînd în fixarea și efectuare de secțiuni fine, se realizează prin marcarea locurilor anionice. Fața externă a hematiei de om conține numeroase sarcini negative, care corespund în particular acidului sialic situat la extremitatea

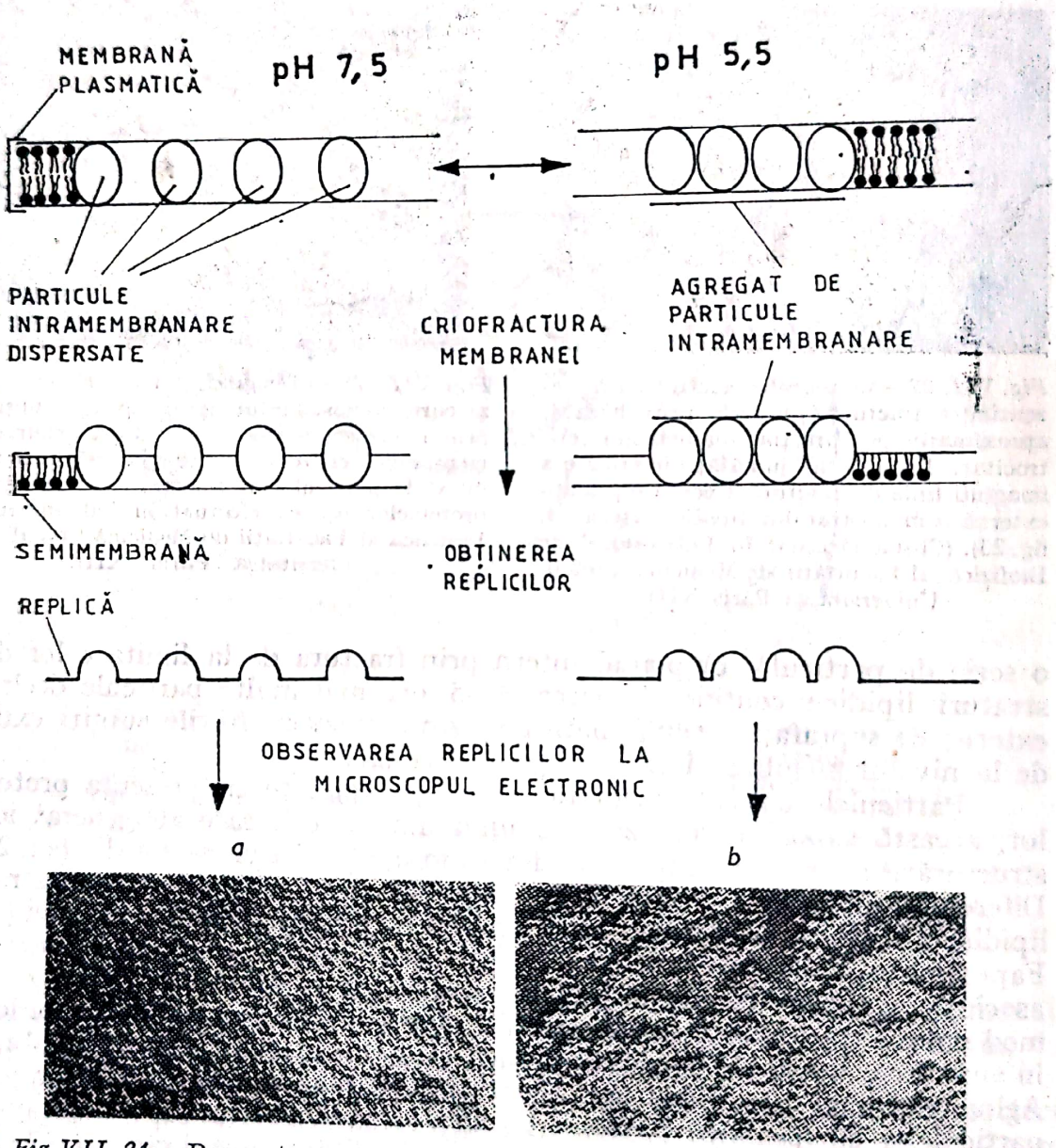
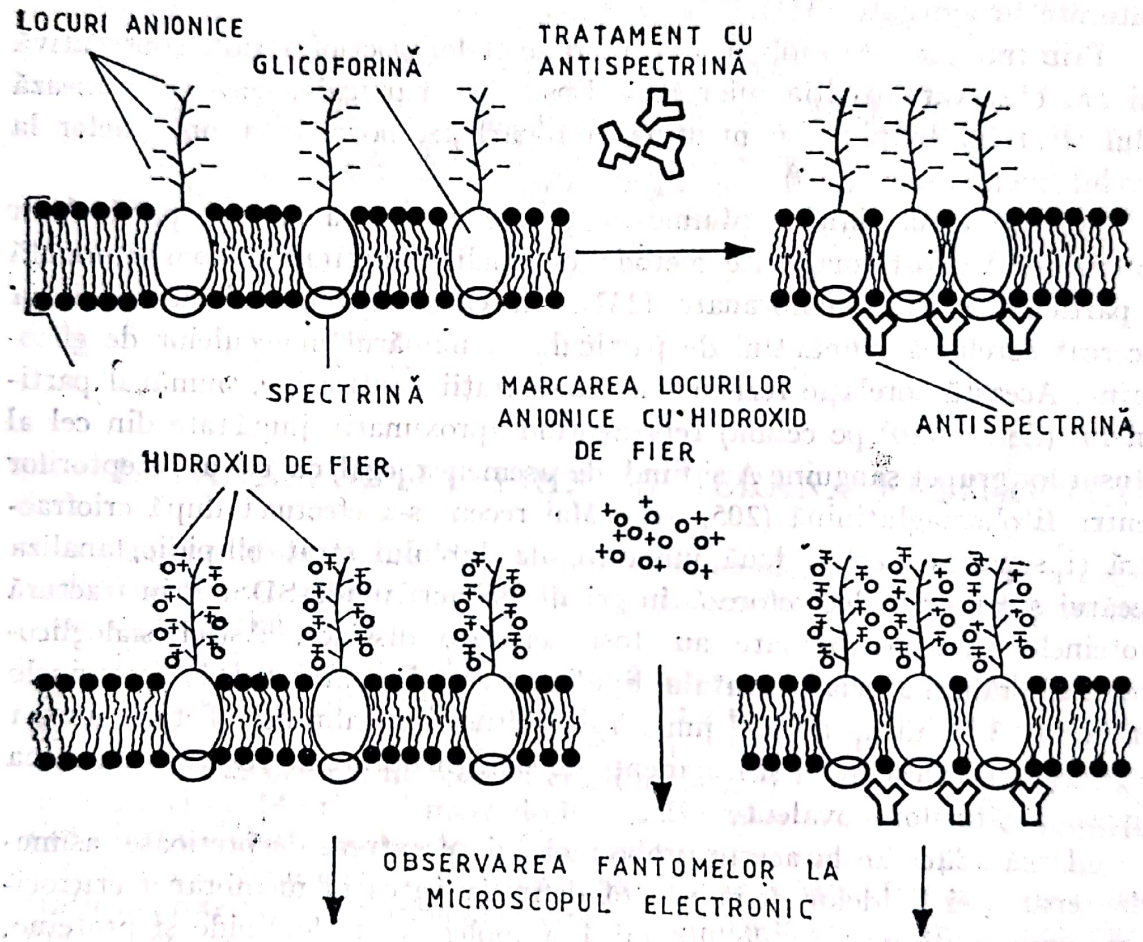


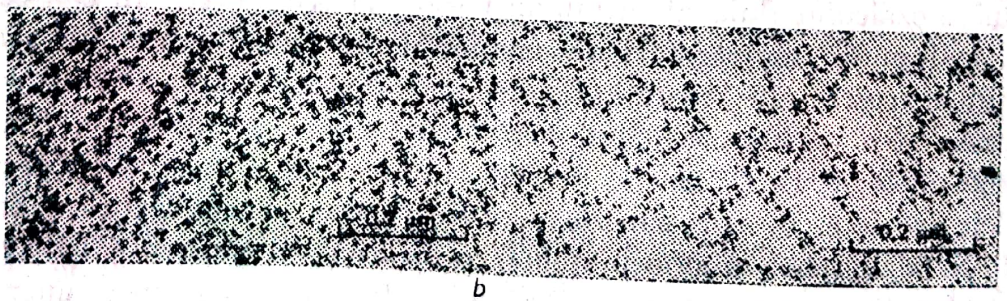
Fig. VII. 24 — Demonstrarea cu certitudine, prin criofractură în vid și examinare consecutivă a replicilor la microscopul electronic cu transmisie, a mișcării proteinelor integrale în planul membranei; explicații în text (După A. Berkaloff și colab., 1979) (29).

Scanned with OKEN Scanner

lanțurilor polizaharidice ale glicoforinei (fig. 25). Localizarea sarcinilor negative ale membranelor se efectuează cu particule coloidale de hidroxid de fier, care fiind încărcate pozitiv se vor atașa, prin interacțiuni electrostatice, pe situsurile anionice. Marcajul cu hidroxid de fier permite recunoașterea acestora din urmă, deoarece fierul difuzează puternic electronii, astfel încît, particulele coloidale apar pe micrografie sub forma unor granule negre. Practic, fantomele eritrocitare sînt montate pe un film suport și incubate într-o soluție de hidroxid de fier. La examinarea inițială a fantomelor se constată o dispunere dispersată a locurilor anionice. După incubarea timp de

a





b

Fig. VII. 25 — Punerea în evidență a dinamicii proteinelor integrale ale membranei prin marcarea locurilor anionice (După A. Berkaloff și colab., 1977; micrografii electronice P. Pinto da Silva, 1973) (29, 247).

Scanned with OKEN Scanner

30 de minute cu anticorpi antispectrină se constată că acest tratament a provocat agregarea situsurilor de legare. Se presupune că spectrina, proteină periferică situată în partea citoplasmatică a membranei, se asociază la zona hidrofilă C-terminală a glicoforinei. Antispectrina se atașează prin unul din cele două locuri de legare la spectrină. După fixarea anticorpilor se produce o difuziune în planul membranei, adică în stratul dublu lipidic, a complexelor glicoforină-spectrină-antispectrină, pînă la aglomerarea lor. Cînd aceste ansambluri moleculare sînt suficient de apropiate, locul secund de legare de la nivelul anticorpilor antispectrină se atașează la spectrina dintr-un ansamblu vecin. În aceste condiții, complexele spectrină-glicoforină sînt menținute alăturate în agregate (231).

Prin tratarea cu fosfolipază A_2 a eritrocitelor și criofractură consecutivă noi am observat apariția unor zone lipsite de particule, ceea ce probează rolul stratului bilipidic în menținerea repartiției normale a proteinelor la nivelul membranei (269).

O problemă dificilă rămîne stabilirea exactă a naturii particulelor observate. Au fost imaginate metode de analiză cantitativă computerizată a particulelor intramembranare (232). În cazul membranei hematiei s-a încercat corelarea numărului de particule cu numărul moleculelor de glicoforină. Această corelație rezistă unei comparații cantitative, numărul particulelor (de 5×10^5 pe celulă) reprezentînd aproximativ jumătate din cel al situsurilor grupei sanguine A și fiind, de asemenea, egal cu cel al receptorilor pentru fitohemaglutinină (205, 311). Mai recent s-a efectuat după criofractură și separarea celor două jumătăți ale dublului strat bilipidic, analiza fiecărui strat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă-SDS. Prin fractură proteinele transmembranare au fost separate distinct. Astfel, sialoglicoproteinele rămîn asociate stratului lipidic extern al membranei, iar proteinele din banda 3 rămîn la nivelul jumătății interne a membranei. Totuși, uneori se regăsesc la acest nivel și fragmente de sialoglicoproteine rezultate în urma ruperii legăturilor covalente (92).

Dacă adăugăm la aceste probe moleculare extrem de prețioase, asimetria repartiției lipidelor demonstrată definitiv în cazul membranei eritrocitare, precum și probele de dinamică a moleculelor de lipide și proteine, modelul mozaicului fluid al membranei este clar confirmat. În consecință, există mai multe reprezentări de ansamblu ale membranei eritrocitare. Una dintre acestea este redată în fig. 26, zona de sus a schemei corespunzînd feței interne a membranei. Sînt menționate proteinele integrale, banda 3 și glicoforinele A, B, C, care la nivelul feței externe a membranei prezintă glucidele asociate. În zona superioară a figurii sînt schematizate componentele de bază ale scheletului membranei, cu mențiunea că banda 6 (gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza) apare legată la banda 3, conform unor date recente. În reprezentare s-a ținut seama de interacțiunile dintre molecule, descrise anterior.

Scanned with OKEN Scanner

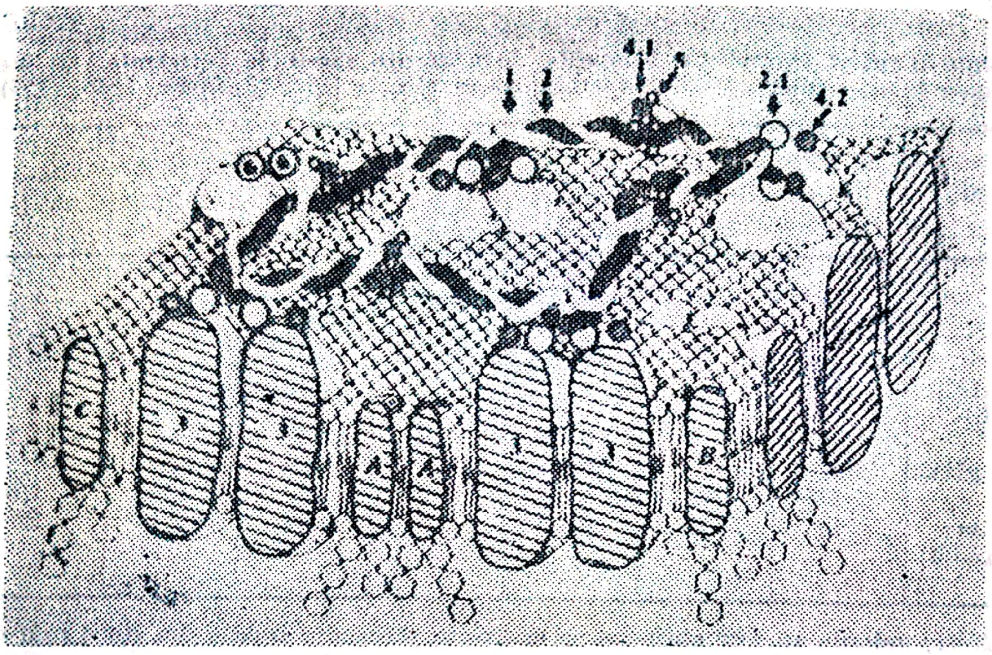


Fig. VII. 26 — Organizarea și orientarea proteinelor și glicoproteinelor în membrana eritrocitară (După M. Tao și R. G. Conway, 1982) (323).

4. TRANSPORTUL PRIN MEMBRANA ERITROCITARĂ

După o lungă perioadă de scriere fenomenologică, în prezent a început definirea bazelor moleculare precise ale proceselor de transport prin membrana globulului roșu.

Compoziția hematiei diferă în mod marcat de cea a mediului fiziologic de suspensie. Concentrațiile de clor și bicarbonat din interiorul eritrocitului de cm sînt mai mici decît cele din plasmă; concentrația intracelulară a K^+ este de circa 29 ori mai mare decît cea din plasmă, iar cea a Na^+ de la nivelul plasmei de 14 ori mai mare decît cea din interiorul celulei. Concentrația Ca^{2+} intracelular este foarte redusă, în timp ce concentrația plasmatică a cationului este de circa 2 mM. Cea mai frapantă este diferența de concentrație în proteine (hemoglobină) de circa 5 mM în eritrocit, în timp ce proteinele din plasmă reprezintă sub 1 mM (270). În ciuda acestor mari diferențe de compoziție, eritrocitul își menține starea staționară, datorită unor caracteristici de permeabilitate ale membranei și a coexistenței unor mecanisme de transport.

Obligați din nou la o selecție de date mai mult decît restrictivă, vom prezenta doar cîteva caracteristici esențiale ale transportului prin membrana globulului roșu.

În tabelul VII sînt prezentate valorile compoziției ionice a eritrocitelor provenind de la diferite specii de vertebrate. Pornind de la faptul că plasma sanguină a mamiferelor și a păsărilor conțin aproximativ 140 mM Na^+ și 4—5 mM K^+, devine clară menținerea la nivelul membranei eritrocitare a unor gradiente de concentrație importante. Astfel, la majoritatea speciilor

TABEL VII

Compoziția în apă și electroliți a hematiilor de la diferite specii de vertebrate, cu includerea unor indici celulari. (Date din literatură reunite de J. F. Hoffman, 1986) (153)

Specii	$[Na_c^+]$	$[K_c^+]$	$V_{apă}$ (ml/ml)	Cl_i^- / Cl_e^-	Aria suprafeței (μm^2)	Volum celular (μm^3)	E_{Cl} (mV)	E_m (mV)
	pe litru de apă celulară							
Om	11	140	0,70	0,69	133	87	−9	−9
Oaie HK	41	127	0,73	0,70	67	30	−9,5	—
Oaie LK	144	22	0,72	0,72	67	30	−8,8	—
Capră HK	15	105	—	—	33	18	—	—
Capră LK	80	45	—	—	33	18	—	—
Câine	162	8	0,64	0,65	117	67	−11,5	—
Pui de găină	17	170	0,63	0,70	180	120	−9,5	—
Rață	11,5	164	0,70	0,60	160	130	−13,6	—
Amphiuma (salamandră)	16	155	0,73	0,63	4000	14×10^3	−15	−19

Notă: valorile au fost obținute pe eritrocite proaspete izolate din sînge prin centrifugare și spălate în medii izotone. Plasma mamiferelor și a păsărilor conține aproximativ 140 mM Na^+ și 4—5 mM K^+; plasma salamandrei *Amphiuma* conține circa 100 mM Na^+ și 3—4 mM K^+. E_m se referă la potențialul de membrană, față internă în raport cu cea externă. HK și LK semnifică K-crescut *(high)* și K-scăzut *(low)* în hematii.

K^+ este mai crescut în celule, iar Na^+ mai redus în raport cu concentrațiile din plasmă. Globulele roșii de la câine (și pisică) fac excepție de la această generalizare. La oaie și la capră există un dismorfism al conținutului în Na^+ și K^+ funcție de specie, dar celulele cu un conținut scăzut de K^+ (LK) mențin, de asemenea, gradiente substanțiale pentru Na^+ și K^+.

Diferențele în compoziția ionică a celulelor în raport cu plasma sanguină rămîn nealterate pe toată durata circuitului fiziologic al hematiei în rețeaua vasculară. Modificarea acelorași diferențe acompaniază foarte multe stări patologice, unele fără relație aparentă cu eritrocitul. Diverse variații, uneori controversate, au fost raportate și în cursul îmbătrînirii fiziologice a globulului roșu.

În prezent este clar că activitatea unor ioni ca Na^+, K^+ și Cl^- din eritrocite este în esență identică cu activitatea acelorași ioni liberi ori în soluție. De asemenea, hemoglobina nu fixează în proporție semnificativă ionii menționați (94, 122). Repartiția inegală a Na^+ și K^+ nu poate fi deci explicată prin eventuala legare intracelulară a ionilor, ci exclusiv prin intervenția membranei celulare. Globulele roșii prezintă o permeabilitate neobișnuit de scăzută pentru Na^+ și K^+ în comparație cu alte tipuri celulare, ca neuronii și celulele musculare. Dimpotrivă, eritrocitele posedă o permeabilitate extrem de crescută pentru Cl^- și HCO_3^-, rata de schimb izotopic, măsurată în milisecunde, fiind de 10^6 ori mai mare decît cea pentru Na^+ și K^+. S-a demonstrat, însă, că raportul P_{Cl}/P_K este doar 100, ceea ce înseamnă că fluxul izotopic al Cl^- se produce în cea mai mare parte prin schimb mediat (158).

Deoarece hematia este permeabilă pentru Na^+, K^+, Cl^- și apă, devine necesară explicarea modului în care celula poate menține deopotrivă o distribuție inegală a ionilor și un volum constant. În plus, în celulă există

Scanned with OKEN Scanner

anioni impermeanți sub formă de hemoglobină și fosfați organici (153, 270). Dacă forțele pasive sînt operative, trebuie luată în considerare producerea unui echilibru de tip Gibbs-Donnan. Se știe că în absența oricărui gradient de temperatură acest echilibru reprezintă balanța forțelor determinate de diferențele de concentrație, potențial electric și presiune hidrostatică existente la nivelul membranei. În consecință, la echilibru ar trebui să se dezvolte o presiune hidrostatică opusă gradientului creat de existența anionilor impermeanți intracelulari. Magnitudinea diferenței de presiune hidrostatică, reprezentînd echivalentul osmotic al celor 33 mM anioni ficși intracelulari, este de peste 7 000 mm H_2O. Această supoziție vine în contrast cu faptul că tensiunea de suprafață a hematiei este mică (circa 1 dyne/cm) și celula suportă fără riscul hemolizei un gradient de presiune de circa 65 mm H_2O (154). S-a mai precizat că diferența de presiune hidrostatică reală este mai mică decît 3 mm H_2O (255). Activitatea apei din interiorul celulei este aceeași cu a apei din exterior și ca urmare nu există un gradient de presiune hidrostatică apreciabil la nivelul membranei (182). De aceea, devine clar că la nivelul globulelor roșii nu se produce un echilibru Donnan adevărat, existînd alte alternative de reglare a volumului celular.

Pentru înțelegerea modului în care mecanismele osmotice controlează volumul globulelor roșii s-a propus un echilibru Donnan „dublu", considerîndu-se existența unor specii nepermeante atît în celulă cît și extracelular. Se pot distinge două tipuri de echilibru Donnan „dublu": a) în primul, în condițiile în care hematia este permeabilă la Na^+, K^+ și Cl^-, a fost adăugată în mediul extern o substanță nepermeantă, de exemplu sucroza; pentru o concentrație dată de sucroză, celula prezintă un volum constant, ceea ce înseamnă că moleculele nepermeante contrabalansează concentrația osmotică a speciilor fixe intracelulare; b) o a doua situație se referă la circumstanțele în care membrana este efectiv impermeabilă la cationi ca Na^+ și K^+ dar nu și la anioni, ca de exemplu Cl^-; în acest caz, în reglarea volumului celular intervine transportul activ de $Na^+ - K^+$, aspect la care ne vom referi ulterior.

În continuare, vom prezenta pe scurt o serie de date esențiale asupra transportului apei, anionilor și cationilor prin membrana hematiei.

4.1. Permeabilitatea pentru apă și neelectroliți

Deși intens cercetată, permeabilitatea hematiei pentru apă nu este încă explicată clar. Moleculele de apă difuzează foarte rapid la nivelul dublului strat lipidic, cu toate că sînt relativ insolubile în ulei. Cel puțin în parte, difuziunea crescută este indusă de faptul că moleculele de apă sînt mici și neîncărcate electric. De asemenea, structura de dipol a moleculei de apă permite traversarea, cu o viteză excepțională, a regiunilor dublului strat care conțin grupări polare lipidice.

S-a afirmat că permeabilitatea globulului roșu la apă și neelectroliți pare determinată de principii fizice, neimplicînd existența unui mecanism specializat în membrană (270). Totuși, trecerea se produce mult mai rapid decît ar impune-o considerentele pur fizice. De aceea s-a emis ipoteza exis-

Scanned with OKEN Scanner

tenței unor „canale" sau „pori", cu diametrul în cazul hematiei de circa 3,5 Å (152, 284).

În prezent coexistă două mecanisme ipotetice: primul implicînd stratul dublu lipidic, iar cel de al doilea existența unor „canale", reprezentate de proteine (fig. 27). Primul model pornește de la ideea că fluctuațiile termice produc la nivelul lanțurilor hidrocarbonate lipidice o serie de defecte de structură, bucle, răsuciri *(„kinks")*; ele se deplasează de la o față a membranei la cealaltă și, deoarece conțin în interior mici volume libere, pot reprezenta transportori intrinseci pentru apă și neelectroliți. Totuși coeficientul de permeabilitate al membranei pentru apă, calculat pentru acest mecanism,

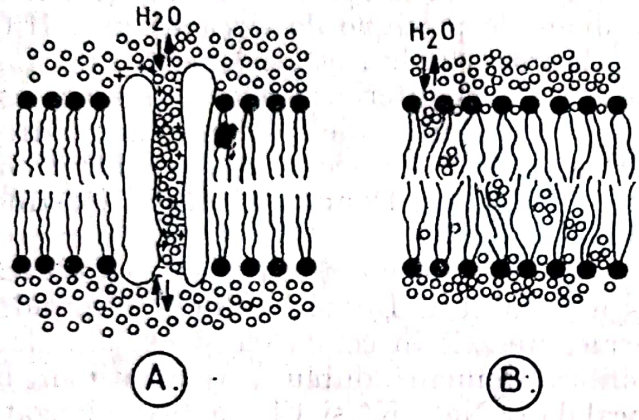


Fig. VII. 27 — Reprezentarea schematică a două modele posibile pentru căile hidrofile destinate transportului apei la nivelul membranei eritrocitare: A) pori asamblați din proteine integrale ale membranei care sînt agregate în subunități identice sau neidentice; B) prin stratul bilipidic ca urmare a volumelor libere generate de fluctuațiile lipidelor din membrană (După R. I. Sha'afi, 1977) (283).

este de 10 ori mai mic decît cel determinat experimental. Aceasta înseamnă că doar circa 10% din transportul apei se produce prin stratul bilipidic, restul de 90% avînd loc prin „canale" proteice (283). Ipoteza existenței acestora este susținută experimental de blocarea transportului apei prin substanțe care reacționează cu grupările SH și anume, paracloromercuribenzoatul de Na sau acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB). S-a sugerat implicarea proteinei din banda 3, sau a unor polipeptide care migrează prin electroforeză în aceeași zonă (51). Supoziția este susținută de fixarea DTNB la nivelul benzii 3. Recent s-a corelat inhibiția transportului apei din derivați de mercur cu legarea ^{203}Hg-PCMBS (p-cloromercuribenzen-sulfonatul) la nivelul proteinelor membranare. Gh. Benga și colab. găsesc o inhibiție maximă cînd legarea este de circa 10 nmol/mg proteine. După electroforeza pe gel de poliacrilamidă s-a constatat că benzile 3 și 4.5 îndeplinesc această condiție. Se sugerează astfel asocierea acestor două proteine în canale pentru transportul apei la nivelul membranei eritrocitare (26).

Recent, A. K. Solomon și colab. (303) au postulat existența unui por apos cu diametrul de 0,9 nm situat între doi monomeri ai proteinei banda 3. Acest por ar servi drept cale comună pentru toți solviții esențiali, suficient de mici, incluzînd anionii, cationii și neelectroliții, precum și apa, solventul lor în organism. Se susține că ipoteza unei singure căi de transport pentru un mare număr de permeanți, deși este simplificatoare, rămîne în acord cu numărul redus de proteine integrale de la nivelul membranei eritrocitare. Evident, această ipoteză trebuie demonstrată, în particular este necesar să se probeze legătura canalelor pentru apă cu transportul ionic. Se știe, însă, că există inhibitori specifici ai transportului de anioni și, respectiv, ai transportului apei. Cum se explică această inhibiție selectivă în condițiile existenței unui „por unic"? Argumentele invocate în cazul acestor constatări experimentale

Scanned with OKEN Scanner

foarte cunoscute sînt: a) DIDS (4,4'-diizo-tiociano-2,2' ditriostilben-disulfonat) inhibă schimbul de anioni și conductanța membranei, fără efect asupra permeabilității pentru apă și uree, prin pătrunderea în canale și acțiunea asupra locurilor de legare; se produc modificări conformaționale ale proteinelor, fără „blocarea" canalelor, care rămîn deschise pentru apă și uree; b) p-PCMBS, dimpotrivă, inhibă drastic permeabilitatea pentru apă, dar nu are efecte asupra schimbului de anioni și a conductanței; ipotetic, nici de astă dată canalele nu sînt închise, dar devin mai înguste, nepermițînd trecerea apei. Nu se poate explica, însă, trecerea ionilor Cl^- care, hidratați fiind, prezintă o rază mare. În plus, se afirmă că sporirea permeabilității pentru cationi, care acompaniază suprimarea transportului pentru apă, în cazul p-CMBS s-ar putea explica prin îndepărtarea sarcinilor pozitive de la nivelul canalelor, unii cationi pătrunzînd prin canale, chiar în condițiile îngustării lor.

Nu este, totuși, exclus ca aceleași macromolecule membranare să fie implicate, prin „locusuri" diferite în mai multe sisteme de transport „independente".

R. I. Sha'afi nu exclude localizarea „porilor" chiar la nivelul ambelor proteine integrale majore ale membranei eritrocitare, banda 3 și glicoforina A. În opinia sa, căile hidrofile nu trebuie considerate ca niște „pori" cilindrici ficși, de structură și dimensiuni statice. Ei pot fi asamblați din proteinele integrale ale membranei, care sînt reprezentate, probabil, din agregate de subunități identice ori diferite (283). Totuși, rezultatele foarte recente, bazate pe „disecția" chimică a macromoleculelor, tind să implice proteina din banda 3.

Probele cele mai convingătoare pentru existența canalelor se obțin, pentru moment, prin compararea permeabilității membranei eritrocitare cu cea a membranelor artificiale bilipidice. De notat că prin criofractură nu s-au constatat modificări ale membranelor în urma tratării celulelor cu reactivi sulfhidrilici (202).

Se presupune că o parte din „porii apoși" ar permite trecerea exclusiv a moleculelor de apă, iar o altă parte trecerea atît a apei, cît și a neelectroliților. Experimental este posibilă inhibarea selectivă cu fluoretină a transportului de neelectroliți, concomitent cu o creștere ușoară a transportului apei. Fenomenul este explicat prin modificări alosterice ale proteinelor canal.

Dintre neelectroliți, transportul ureei a fost intensiv cercetat, datorită importanței sale fiziologice. Ureea, deși substanță hidrofilă capabilă să formeze 5 legături de hidrogen cu apa, este extrem de permeantă prin membrana eritrocitară. S-au obținut argumente experimentale atît pentru trecerea ureei prin „căile apoase" cît și în favoarea coexistenței unui mecanism de difuziune facilitată. Nu este însă posibil să se decidă care dintre cele două mecanisme este responsabil de rata înaltă a transportului ureei. Totuși, cel puțin în cazul traversării de către eritrocite a circulației renale, transportul rapid al ureei prin difuziune facilitată contribuie la prezervarea stabilității osmotice și a deformabilității hematiei. În același timp, trecerea ureei în hematii previne disiparea gradienților osmotici extracelulari.

4.2. Transportul eritrocitar al anionilor

În majoritatea celulelor, cationii sînt implicați direct în procesele fiziologice fundamentale, de aceea transportul anionilor a fost considerat doar o simplă condiție de menținere a electroneutralității. Pentru eritrocit și rinichi

Scanned with OKEN Scanner

schimbul Cl^-/HCO_3^- prezintă însă o importanță particulară. În cazul globulului roșu, cunoașterea transportului anionilor a fost revoluționată prin descoperirea specificității sale și a rolului proteinei din banda 3 în acest proces (55). La nivelul țesuturilor, CO_2 difuzează rapid în eritrocite, unde este hidratat și convertit în H^+ și HCO_3^-, printr-o reacție catalizată de anhidraza carbonică. Protonii sînt tamponați de hemoglobină, iar mecanismul de transport anionic din membrana hematiei schimbă HCO_3^- celular cu Cl^- plasmatic. În felul acesta, CO_2 produs prin metabolism este transportat în plămîni sub forma HCO_3^- din plasmă. La nivelul capilarelor pulmonare procesul este invers: HCO_3^- plasmatic pătrunde în hematie prin schimb cu Cl^-, intracelular. Va rezulta acid carbonic, iar prin dehidratarea acestuia CO_2, care va difuza în spațiul alveolar. Deoarece timpul de trecere al globulelor roșii în capilarele pulmonare este sub 1 secundă, iar în efortul fizic de 1/4 secunde, schimburile trebuie să se producă foarte rapid (123). În prezent există probe certe, la nivel molecular, legate de modul în care membrana asigură rata maximă a transportului. Astfel, membrana eritrocitară conține o mare cantitate de proteină din banda 3, de 95 000 daltoni, care s-a dovedit a fi (prin metode de marcare chimică și prin tehnici de reconstituire) mediatorul schimbului anionic (55, 181). Prin tehnici variate numărul de molecule din banda 3 a fost estimat între 800 000 și 1 200 000 pentru fiecare celulă, reprezentînd 25—30% din totalul proteinelor membranare (98, 182).

Anionii Cl^- trec prin membrană în combinație cu locurile de transport de la nivelul proteinei benzii 3, care este astfel structurată încît permite trecerea ionilor unul cîte unul și în foarte mică măsură printr-un flux net anionic.

Schimbul anionic se desfășoară foarte rapid, conform imperativelor fiziologice. Astfel, Cl^- este transportat de un milion de ori mai rapid decît un cation de dimensiuni asemănătoare, K^+. În ciuda rapiditidății sale, sistemul de schimb anionic este foarte selectiv, Cl^- și HCO_3^- fiind transportați rapid, în timp ce F^-, Br^- și I^- trec într-un grad mult mai redus. Anionii divalenți, ca sulfatul, sînt transportați de 1 000 pînă la 10 000 ori mai lent decît Cl^-. Se consideră că această selectivitate nu este în relație cu afinitatea diferiților ioni pentru locurile pentru transport de la nivelul proteinei, ci cu rapiditatea cu care complexele locuri de transport — anioni sînt translocate prin membrană (181, 182). Translocarea este frecvent descrisă cinetic ca fiind o mișcare a locului de transport, sau a „transportorului" prin membrană. În realitate, posibilitatea unei modificări conformaționale a proteinei banda 3 pare mai plauzibilă. Această modificare face accesibil alternativ, locul de fixare anionică pe o față a membranei sau pe cealaltă.

În adiție la locul pentru transport, sistemul de transport anionic conține și locuri de inhibare a transportului. Date recente arată că la celulele intacte Cl^- transportat variază independent pe cele două fețe ale membranei, iar locul primar de inhibare a transportului se află pe fața internă a membranei. Există, probabil, de asemenea, locuri de modificare a transportului și la nivelul suprafeței celulare. În cazul cînd concentrația anionilor (Cl^-, SO_4^{2-}, Br^-) depășește la nivelul ambelor fețe ale membranei 150—200 mM, fluxul unidirecțional al anionilor respectivi descrește. În această situație relația cu locurile de legare nu este clară (264).

Dependența de pH a fluxurilor de anioni catalizate de banda 3 a fost larg examinată. Scăderea pH-ului sub 7,4 activează puternic influxul de SO_4^{2-}

Scanned with OKEN Scanner

în celulele încărcate cu Cl^-. Fluxul de Cl^- este independent atît de pH-ul extracelular cît și de pH-ul intracelular (la 0°C) între valorile de pH 7—10 (347).

S-a constatat o asimetrie funcțională a schimbului anionic, care ar putea fi expresia unei asimetrii reale a locurilor de legare pe cele două fețe ale membranei. O asemenea asimetrie poate reflecta diferențele de energie liberă dintre conformațiile interne și externe ale complexului clor-banda 3.

Schimbul anionilor unul cîte unul poate fi explicat prin două mecanisme. În acord cu mecanismul simultan, există două locuri de transport anionic, cîte unul pe fiecare față a membranei. Numai în momentul încărcării ambelor locuri are loc translocarea simultană a celor doi anioni. În contrast, modelul ping-pong postulează existența unui singur loc de transport, care alternează de pe fața internă (F_i) pe fața externă (F_e). Conform acestui model relația

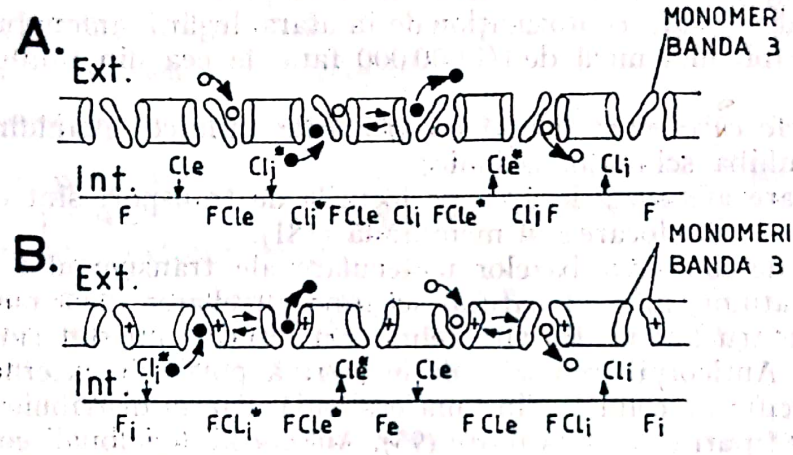


Fig. VII. 28 — Mecanisme posibile ale schimbului de anioni unul cîte unul. Exemplele prezintă cazul cînd Cl^- intracelular este radiomarcat ($Cl^×$, figurat sub forma unor cerculețe negre): A) mecanismul simultan; B) modelul în ping-pong (După P. A. Knauf) (1986) (181).

strînsă de cuplare între influxul și efluxul de anioni este explicată prin modificarea locului de transport. Aceasta s-ar produce printr-o schimbare de conformație din F_i în F_e (fig. 28).

Deși transportul implică modificări conformaționale ale complexului proteină-anion, natura acestora nu este, deocamdată, cunoscută în detaliu. În prezent cercetările se concentrează asupra descifrării structurii primare și conformaționale a proteinei din banda 3. În ansamblu, banda 3 este alcătuită din 3 segmente: segmentul citoplasmatic N-terminal de 40—42 Kd, segmentul de 17 Kd și segmentul C-terminal de 35 Kd. S-au obținut date convingătoare asupra implicării segmentului C-terminal, de pe fața externă a membranei, în transportul anionilor. Astfel H_2DIDS (4,4'-diizotiociano-1,2-difeniletan-2,2'-disulfonatul), inhibitor competitiv bifuncțional prezintă loc de legare în segmentul C, reacționînd probabil cu lizina. Metilarea lizinei inhibă de asemenea schimbul de Cl^-. Piridoxal-fosfatul (PDP) și fenilizotiocianatul (PITC) inhibă schimbul anionic, probabil prin modificarea grupărilor amino în segmentul C. O serie de alți inhibitori acționează, de asemenea, la acest nivel.

S-a postulat existența unui „por" hidrofil, în membrană, format din 2 monomeri. Ipoteza nu pare plauzibilă, deoarece anionii amfifili, cu „cozi" hidrofobe sînt transportați de către banda 3 (182). Pînă în prezent, se pare

Scanned with OKEN Scanner

că fiecare monomer al benzii 3 funcționează independent în transportul anionilor. Este posibil, dar nu s-a demonstrat, ca oligomerii importanți să fie implicați și în alte funcții de transport, cum ar fi transportul apei, ca și al cationilor (303), ipoteză pe care am menționat-o în subcapitolul 5.1.

Recent (1986), P. A. Knauf a precizat datele fundamentale, obținute pînă în prezent, care trebuie incluse în orice încercare de elaborare a unui model al schimbului anionic: a) anionii sînt transportați foarte rapid, probabil printr-un mecanism de ping-pong, ceea ce presupune oscilația proteinei banda 3 între două stări conformaționale;
b) în ciuda acestor schimbări în orientarea situsului de transport, banda 3 rămîne fixată în membrană, cu porțiuni diferite față de citoplasmă și de mediu;
c) ritmul schimbărilor de conformație este puternic dependent de natura anionului legat la nivelul locului de transport;
d) rata modificărilor conformaționale în afara legării anionului este foarte redusă probabil mai mică de 1/1 000 000 față de cea din timpul schimbului anionic;
e) substanțele care reacționează cu grupările aminice, guanidinice și carboxilice pot inhiba schimbul anionic;
f) factorii care afectează legarea pe locurile de transport sînt diferiți de cei care afectează translocarea în membrană (181).

După descoperirea bazelor moleculare ale transportului de anioni la nivelul hematiilor, în mod natural se pune întrebarea dacă mecanismele de transport pentru anioni din alte celule sau țesuturi nu sînt similare cu cele eritrocitare. Anticorpii monoclonali împotriva porțiunii externe a benzii 3 se leagă specific pe celulele din linia eritroidă, dar se distribuie mai puțin la nivelul unor tipuri celulare variate (93). Anticorpii policlonali contra benzii 3 purificate se leagă, de asemenea, pe diferite celule, iar în cazul leucocitelor la nivelul unei proteine de 95 Kd, care prezintă cîteva similitudini cu banda 3 eritrocitară. Studii viitoare, efectuate cu anticorpi monoclonali, pot clarifica aceste aspecte, iar deoarece materialul genetic ce codifică banda 3 a fost izolat, tehnicile de hibridare vor clarifica dacă și alte celule sintetizează proteine analoge benzii 3.

Chiar dacă nu se constată omologii la nivelul secvențelor de aminoacizi, pot exista însă similitudini funcționale. Aceasta este posibil și în cazul unor sisteme de transport cu caracteristici diferite de cele mediate de banda 3.

Vom mai menționa faptul că, adițional schimbului anionic, pentru eritrocitele de la o serie de specii s-au pus în evidență sisteme variate de cotransport al anionilor și cationilor, analoge cu cele observate la alte tipuri celulare. Banda 3 poate acționa, de asemenea, ca un sistem de cotransport pentru ionii sulfat și protoni.

4.3. Transportul activ de Na^+ și K^+

Mecanismele moleculare de bază ale transportului activ de Na^+ și K^+ nu diferă, în esență, în cazul hematiilor în raport cu celelalte celule (a se vedea cap. IV). De aceea, ne vom referi doar la particularitățile pompei eritrocitare, menționînd în prealabil că și în acest caz hematia a constituit modelul de studiu cel mai frecvent utilizat, cu toate că eritrocitele prezintă o activitate mult mai redusă a pompei: circa 1/170 față de membranele neuronale, sau

Scanned with OKEN Scanner

1/400 în raport cu membranele renale. Ca urmare, în momentul izolării și caracterizării (Na^+, K^+)-ATP-azei au fost preferate membranele celulelor medulare renale și ale celulelor neuronale. În prezent se știe că (Na^+, K^+)-ATP-aza reprezintă însăși „pompa" responsabilă de transportul activ.

TABEL VIII

Activitățile (Na^+, K^+)-ATP-azei la diferite membrane celulare (μ mol fosfat/mg proteine din membrană/oră) (După E. N. Wardle, 1985) (337)

Rinichi	150—250
Cortex cerebral	50
Inimă (miocard)	10— 20
Leucocite	0, 16
Eritrocite	0,03*

* Echivalentă cu 3 mmol sodiu/l celule/oră

Înainte de prezentarea caracteristicilor pompei de Na^+, K^+ eritrocitare vom menționa pe scurt cîteva momente în care hematia a reprezentat un model experimental extrem de util.

Încă din anul 1941 s-a demonstrat că hematiile pierd K^+ și cîștigă Na^+ cînd sînt stocate la rece sau private de glucoză. J.E. Harris (citat de 64) a descoperit că reîncălzirea sau adăugarea de glucoză conducea la reacumularea de K^+ și extruziunea Na^+.

După anul 1941 era stabilită cu certitudine existența în eritrocite, ca și în alte celule animale, prezența unei translocări, dependentă metabolic, a Na^+ și K^+ împotriva gradientelor acestora. A urmat, în 1953, un moment care a propulsat cercetarea și anume, descoperirea de către H.J. Schatzmann, pe eritrocite, a inhibării procesului de către steroizii cardiotonici, ca ouabaïna și strofantidina (276). Utilizarea acestui tip de inhitori a deschis calea evaluării precise ale componentelor fluxului de transport activ. Inhibitorii specifici pentru transportul activ nu au nici un efect asupra fluxurilor pasive ale Na^+ și K^+. Odată cu prezentarea efectelor glicozizilor, H.J. Schatzmann observă neafectarea transportului glucozei cînd transportul activ era inhibat. Era obținută, astfel, prima probă asupra consumului de energie în cadrul procesului.

Concomitent, încă din 1941, imediat după primele aplicații ale radioizotopilor în biologie, L.J. Mullins și colab. (citați de 64) au măsurat pe eritrocite permeabilitatea pentru ^{42}K, în condiții fiziologice. Odată create aceste premise metodologice a urmat o descriere amănunțită a proprietăților pompei, efectuată preferențial pe eritrocite, pentru care s-au stabilit prin metode reproductibile valorile globale ale fluxurilor de K^+ și Na^+, ca și fracțiunile care corespund transportului activ al ionilor respectivi (v. tabelul IX).

În fine, un moment crucial este anul 1957, cînd J.C. Skou (299) oferă primul descrierea unei enzime ale cărei proprietăți sugerau că ar putea fi responsabilă de transportul activ al Na^+ și K^+. Supoziția existenței „enzimei Skou" era efectuată însă pe nervii periferici. A urmat o diversificare a metodelor utilizate, cu concentrarea cercetărilor către studiul (Na^+, K^+)-ATP-azei, care în prezent se apropie de finalizare (a se vedea cap. IV).

Scanned with OKEN Scanner

TABEL IX

Estimarea influxului de K^+ (ImM_K) și a efluxului de Na^+ (EmM_{Na}) în prezența ouabaïnei (ImM_K^{ouab} și EmM_{Na}^{ouab}) la nivelul eritrocitelor unor specii diferite de vertebrate
(Date reunite din literatură de J. F. Hoffman, 1986, modificat) (153).

Specia	ImM_K	ImM_K^{ouab}	Influx pompă K^+	EmM_{Na}	EmM_{Na}^{ouab}	Eflux pompă Na^+	EmM_{Na}^P/ImM_K^P
Om	2,5	1,6	0,9	3,1	1,7	1,4	1,6
Oaie HK	0,63	0,13	0,50	0,74	0,15	0,59	1,2
Oaie LK	0,72	0,59	0,13	0,99	0,84	0,15	1,2
Capră HK	0,75	0,15	0,60	—	—	—	—
Capră LK	0,41	0,16	0,25	—	—	—	—
Ciine	0,1	0,1	0	10	10	0	—
Pui de găină	1,8	0,8	1,0	1,6	0,4	1,2	1,2
Rață	8,1	3,4	4,7	12,5	8,2	4,3	0,92
Amphiuma (salamandră)	2,0	0,4	1,6	2,7	0,9	1,7	1,1

Notă: Diferența între fluxul de K^+ sau Na^+ în absența sau în prezența ouabaïnei (0,1—1mM) este luată ca măsură a transportului componentelor Na^+ și K^+, prin intermediul pompei active Na^+, K^+. Fluxurile unidirecționale de K^+ și Na^+ au fost determinate utilizînd $^{42}K^+$ și $^{24}Na^+$, la 37°C pentru mamifere și la 20°C pentru *Amphiuma*. Valorile sînt exprimate în milimoli/litru celule, pe oră. I = influx; E = eflux.

Cuantificarea legării ouabaïnei (prin utilizarea ^{3}H-ouabaïnei) a permis să se estimeze că pentru fiecare eritrocit corespund circa 300 „pompe" Na^+, K^+ (169). Numărul de „pompe" (Na^+, K^+)-ATP-azice variază funcție de tipul celular, iar pentru același tip celular este funcție de specie, eritrocitul fiind celula cea mai slab „dotată". Fiecare „pompă" apare ca avînd o capacitate de transport de circa 100—150 ioni de Na^+/sec, funcție de sursă (169).

Tentativele de izolare și de descifrare a alcătuirii moleculare a (Na^+, K^+)-ATP-azei eritrocitare au fost mai puțin fructuoase decît în cazul altor membrane eritrocitare. Masa moleculară a enzimei-pompă a fost estimată, în funcție de metodele utilizate, între 300 000—400 000 daltoni. Pe de altă parte, masa subunităților α este de circa 100 000 d, deci identică cu cea de la nivel renal (178).

Rolul pompei ATP-azei (Na^+, K^+) este mai redus în cazul eritrocitului, datorită destinului fiziologic al celulei. Astfel, (Na^+, K^+)-ATP-aza concură la reglarea volumului celular, în cadrul echilibrului Donnan de tip secund. În esență, echilibrul constă în faptul că „scurgerea" pasivă de Na^+ și K^+ în sensul gradientului electrochimic este contrabalansată exact de ratele transportului activ de Na^+ și K^+. Acest tip de echilibru a fost demonstrat experimental în cazul globulelor roșii de oaie HK și LK. Pe de altă parte, cînd starea staționară este alterată, fie prin creșterea transportului pasiv, fie prin inhibarea transportului activ de Na^+ și K^+, celula devine turgescentă urmînd echilibrul Donnan clasic, conform căruia presiunea coloidosmotică exercitată de anionii impermeanți intracelulari nu va mai fi compensată. De aici rezultă că turgescența celulară sau/și hemoliza pot fi produse pe diferite căi. Experimental au fost diferențiate mai multe situații. Prima constă în utilizarea fantomelor eritrocitare conținînd diferite concentrații de hemoglobină. Turgescența celulelor a fost dependentă de hemoglobina încorporată și nu s-a dove-

Scanned with OKEN Scanner

dit limitată de permeabilitățile cationice (154). Tipul secund implică utilizarea globulelor roșii intacte, care prezintă o creștere a permeabilității pasive pentru Na^+ și K^+, consecutiv iradierii celulelor cu ultraviolete. În acest caz, turgescența celulelor este deopotrivă coloidosmotică și consecutivă modificării permeabilității (154). O a treia abordare ia în considerare consecințele alterării permeabilității globulelor roșii de oaie prin inhibarea pompei (74). În acest caz, existența, funcție de specie a două tipuri de eritrocite, HK (K^+ dominat intracelular) LK (K^+ diminuat extracelular) conduce la o permeabilitate pasivă diferită a Na^+ și K^+. De aici, posibilitatea unei teorii cantitative a variațiilor volumului celular.

Unii autori, disting la nivelul eritrocitelor trei pompe de sodiu. Prima, Ia, reprezintă pompa clasică (Na^+, K^+)-ATP-aza, care este inhibată de ouabaină și caracterizată prin dependența sa de K^+ din mediul extern. Pompa secundă, Ib, este de asemenea inhibată de ouabaină, dar depinde de Na^+ din mediul extern. În fine, cea de a treia pompă, notată II, denumită cotransport de Na^+/K^+ este inhibată de acidul etacrinic (337).

În ultimii ani au fost puse în evidență o multitudine de stări patologice în care activitatea pompei (Na^+, K^+)-ATP-ază prezintă alterări. Obiectivarea acestor perturbări se poate efectua prin mai multe modalități. Cea mai simplă constă în măsurarea directă a conținutului în sodiu și potasiu în eritrocitele spălate. În timp ce hematiile normale conțin 4—10 milimoli Na^+ pe litru de celule, la eritrocitele afectate în cadrul unor procese patologice concentrația Na^+ crește între 15—30 milimoli Na^+/l. Globulele roșii cu o încărcare de sodiu intracelular și cu o scădere a potasiului pot exprima fie absența sau reducerea ATP, fie un defect molecular al (Na^+, K^+)-ATP-azei. Creșterea Na^+ intracelular a fost constatată în anoxie, hipotermie, afecțiuni cardiace avansate însoțite de congestie, diabet necontrolat terapeutic, uremie, infecții severe, stadii terminale ale diferitelor forme de cancer. S-a demonstrat că hipokaliemia sau excesul de digitală pot provoca defecte ale ATP-azei. Toxicitatea plumbului, prin afectarea grupărilor tiol de enzime are efecte similare.

Eritrocitele bolnavilor cu uremie prezintă o activitate a ATP-azei scăzută, probabil, datorită producerii în cadrul sindromului uremic a unor toxine cu efect inhibitor asupra enzimei. Așa se explică de ce conținutul celular în ATP este de obicei ridicat (337). Constatări similare s-au efectuat pe leucocite, al căror conținut în Na^+ este crescut în uremie. Multiple controverse suscită modificarea (Na^+, K^+)-ATP-azei eritrocitare în hipertensiunea arterială esențială și în obezitate.

Numărul de boli în care transportul activ eritrocitar de Na^+ și K^+ se prezintă alterat este extrem de mare. Există, cel puțin pentru moment, trei probleme: a) rezultatele uneori contradictorii, probabil, ca urmare a utilizării unor metode sensibil diferite, sau din cauza prezenței evident mai redusă a pompei în membrana eritrocitară; o valoare redusă a activității (Na^+, K^+)-ATP-azei conduce la variații de asemenea mai reduse și deci mai dificil de cuantificat cu precizie; b) integrarea rezultatelor în explicarea patogeniei diferitelor boli sau, mai clar, stabilirea dacă o anumită anomalie a transportului activ este una din cauzele lanțului patogenetic sau, dimpotrivă, reprezintă doar o consecință, deci un eveniment secundar; c) existența unei variabilități fiziologice, uneori de o anvergură importantă.

O altă alternativă, mai puțin globală, de evaluare a transportului de Na^+ și K^+ constă în măsurarea ^{86}Rb-captării eritrocitare. Aceasta deoarece

Scanned with OKEN Scanner

s-a demonstrat că rubidiul este un analog al K^+. Similitudinea efectelor celor doi cationi a fost constatată încă din secolul trecut de către Ringer. În transportul activ cei doi cationi urmează aceeași cale, afinitatea sistemului de transport fiind chiar mai mare pentru Rb^+, față de K^+ (cu un factor egal cu 1,55). Depresiunea prin glicozizi cardiaci este, în schimb, mai accentuată în cazul K^+ (175). Analogiile celor doi cationi au condus la ideea substituirii K^+ cu Rb^+ în tratamentul consecințelor supradozajului glicozidic la bolnavii cardiaci, acesta din urmă fiind mai rezistent la acțiunea glicozizilor. Experimental, utilizarea ^{86}Rb este preferabilă, deoarece el prezintă un timp fizic de înjumătățire de 18,7 zile, iar ^{42}K de numai 12,7.

Se poate măsura, de asemenea, efluxul de ^{22}Na la globulele roșii încărcate. Mai laborioasă este izolarea membranelor eritrocitare și măsurarea activității ATP-azei direct prin rata de formare a fosfatului din ATP în soluție, sau prin utilizarea (^{32}P)-ATP. O metodă nouă aplicabilă *in vivo* constă în măsurarea captării clorurii de rubidiu de către eritrocite (41).

4.4. Sistemele de transport eritrocitar al Na^+ și variabilitatea lor fiziologică

Încă de la începutul descrierii transportului activ de Na^+ și K^+ s-a constatat existența unor fluxuri ionice rezistente sau insensibile la ouabaină. Ca urmare, s-a sugerat existența unui mecanism activ secund de expulsie a Na^+ eritrocitar, operant în prezența ouabaïnei, cînd pompa de Na^+ este inhibată total (154). În condiții fiziologice, pompa de Na^+ este saturată de K^+ extern doar în proporție de 75%, restul aparținînd fluxurilor pasive (21).

După ce s-a constatat, în mai multe stări patologice, o supraîncărcare cu Na^+ a eritrocitelor, ca și a altor celule, interesul pentru cunoașterea caracteristicilor fluxurilor pasive ale cationului a crescut. Aceasta cu atît mai mult cu cît, uneori, cantitatea crescută de Na^+ intra-eritrocitar coexista cu o activitate normală a pompei Na^+—K^+.

Au fost publicate numeroase rezultate, în urma cărora se consideră că amploarea conținutului celular de sodiu este determinată de rata de intrare a ionului în celulă (influx) și de capacitatea pompei de sodiu de a-l expulza. Acest conținut rezultă din sincronismul a 4 sisteme de transport (fig. 29). Primul, pompa de Na^+—K^+ poate fi relativ ușor diferențiat de celelalte forme de transport. Celelalte sisteme de transport nu sînt inhibate de ouabaină, dar pot fi distinse prin sensibilitatea lor la alți inhibitori, selectivitatea pentru ioni și caracteristicile lor cinetice (56, 153, 181). Concomitent, în globulele roșii există un mecanism simultan cu pompa transport de Na^+ și K^+ intra- sau extra-celular, funcție de gradientele de concentrație ale celor doi ioni. Acest proces este denumit cotransport de sodiu-potasiu și poate fi inhibat de furosemid (57). De aceea, transportul efectuat prin acest sistem poate fi măsurat prin evaluarea influxului de Na^+, efluxului de Na^+ sau efluxului de K^+ sensibile la furosemid. Unii autori denumesc cotransportul cu termenul „pompa II". Rolul său fiziologic nu este deocamdată cunoscut. În globulele roșii suspendate într-un mediu ionic de o compoziție asemănătoare plasmei, nu este clar dacă direcția fluxului net al transportului de Na^+ furosemid-sensibil este spre celulă sau în afara celulei (56). Dimpotrivă, în cazul leucocitelor menținute în mediu fiziologic, transportul de Na^+ sensibil la furosemid se produce în mare măsură, dacă nu exclusiv, spre celule (168).

Scanned with OKEN Scanner

Mai recent a fost descris, sub impulsul utilizării intense a litiului în psihiatrie, un sistem de contratransport sodiu-litiu, inhibat de furosemid și fluoretină, sau de fluoretină singură (58). Pentru evaluarea sa, celulele sînt încărcate cu litiu și se măsoară viteza de scădere a litiului în două medii diferite, dintre care unu conține ioni de Na^+. Se consideră contratransport $Na^+—Li^+$ fracțiunea efluxului de Li^+ care depinde de prezența Na^+ extern. Acest sistem promovează schimbul sodiu-sodiu, litiu-litiu, sau litiu-sodiu. El prezintă o afinitate de 20 ori mai mare pentru litiu și nu acceptă nici un alt cation monovalent sau divalent. La concentrații mari ale Li^+ sau

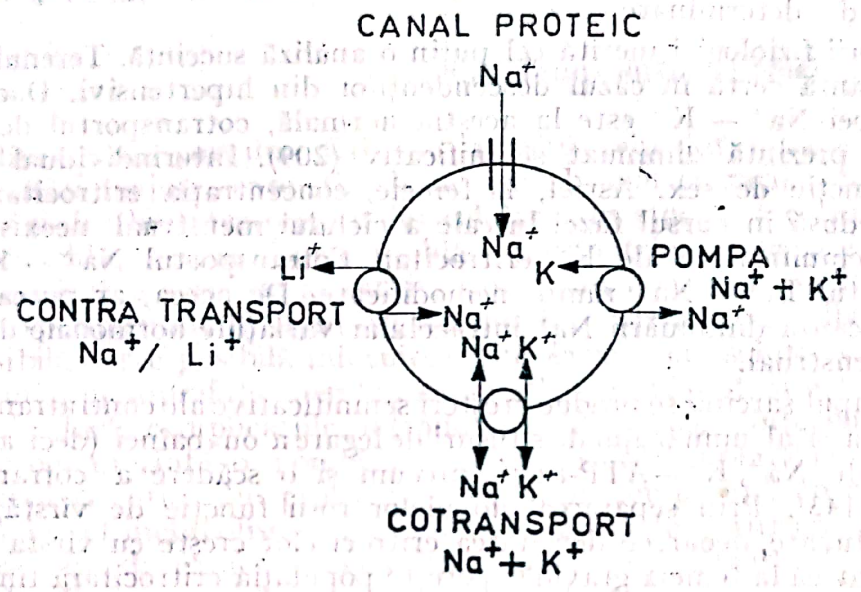


Fig. VII. 29 — Sistemele transportului de sodiu de la nivelul membranei eritrocitare.

Na^+, sau ale ambilor cationi, este saturabil. A fost denumit contratransport $Na^+—Li^+$, deoarece poate produce transportul Li împotriva gradientului său electro-chimic, cu direcția opusă gradientului electro-chimic al Na^+ (57). Rata maximă a contratransportului $Li^+—Na^+$ variază considerabil funcție de subiect, în parte datorită factorilor genetici. În sfîrșit, al patrulea sistem de transport constă în trecerea intracelulară a ionilor de sodiu singuri, consecutivă gradientului de concentrație. Pătrunderea Na^+ s-ar putea produce prin „canale" proteice ipotetice. Nu se poate face o analogie cu canalele de sodiu de la nivelul membranelor celulelor excitabile.

Din existența celor 4 sisteme enumerate rezultă un echilibru dinamic (stare staționară) caracteristic normalului.

Existența sistemelor de transport enumerate complică măsurarea concentrațiilor eritrocitare de Na^+ și K^+ precum și interpretarea rezultatelor obținute. Se adaugă o variabilitate fiziologică, uneori semnificativă. Deoarece anomaliile de concentrație și de transport ale celor doi cationi au dobîndit o semnificație clinică, se observă tendința investigării acestora nu numai în cercetarea fundamentală, dar și în practica medicală. Uneori se susține chiar posibilitatea ca parametrii amintiți să devină un obiectiv de explorare paraclinică de rutină, ceea ce, pentru moment, apare mai puțin posibil.

Scanned with OKEN Scanner

În prealabil, trebuie clarificate două probleme: a) stabilirea precisă a rolului celor doi cationi în diferite procese patogenetice, sau dacă alterările de la nivelul hematiei reprezintă un indicator relevant într-o anumită boală; b) identificarea riguroasă a factorilor de variabilitate a concentrației și transporturilor eritrocitare de Na^+ și K^+.

În esență, variabilitatea poate avea următoarele cauze: a) factori fiziologici, terenul familial, vîrsta, sexul, originea etnică; b) o serie de oscilații intrinseci ale proceselor de transport, ca și ceea ce M. Canessa denumește „polimorfismul transportului eritrocitar de Na^+ și K^+" (56); c) varietatea metodelor de determinare.

Factorii fiziologici merită cel puțin o analiză succintă. Terenul familial are importanță certă în cazul descendenților din hipertensivi. Dacă activitatea pompei $Na^+ — K^+$ este la aceștia normală, cotransportul de sodiu și potasiu se prezintă diminuat semnificativ (209). Interindividual există o variație funcție de sex. Astfel, la femeie, concentrația eritrocitară a Na^+ este mai redusă în cursul fazei luteale a ciclului menstrual, neexistînd însă diferențe semnificative ale K^+ eritrocitar. Cotransportul $Na^+ — K^+$ și contratransportul $Li^+ — Na^+$ rămîn nemodificate. De aceea, ar putea fi invocate drept cauza diminuării Na^+ intracelular variațiile hormonale din cadrul ciclului menstrual.

În timpul sarcinii se produc creșteri semnificative ale contratransportului $Na^+—Li^+$ ca și al numărului de situsuri de legare a ouabaïnei (deci a locurilor de legare ale $Na^+, K^+—ATP$-azei), precum și o scădere a cotransportului $Na^+—K^+$ (143). Prin separarea globulelor roșii funcție de vîrstă, posibilă prin centrifugare, deoarece densitatea eritrocitelor crește cu vîrsta celulelor, s-a constatat că la femeia gravidă sporește populația eritrocitară tînără (209). Această constatare poate explica modificările transportului de cationi depistate la gravide, deoarece s-a confirmat definitiv că vîrsta hematiilor are un efect pronunțat asupra transportului unor cationi. Astfel, la celulele îmbătrînite crește cotransportul $Li^+—K^+$, scade numărul locurilor de legare pentru ouabaină și, consecutiv, efluxul de Na^+ prin intermediul pompei (Na^+,K^+)-ATP-aza și contratransportul Na^+-Li^+ (30,145). Este clar că aceste modificări se vor exprima la toți subiecții care, din motive fiziologice sau patologice, prezintă variații, în raport cu normalul, ale distribuției vîrstei diferitelor populații eritrocitare.

Interesantă, dar încă insuficient susținută de rezultate, este afirmația că proprietățile membranelor eritrocitare variază și funcție de vîrsta organismului. Astfel, scade fluiditatea membranelor la lipozomii preparați din lipidele totale provenite de la eritrocitele subiecților în vîrstă. La aceiași donori scade activitatea (Na^+, K^+)-ATP-azei, îndeosebi la grupa sanguină A; se reduce, de asemenea, acidul sialic (143).

Recent (1986), au fost relevate diferențe ale activității (Na^+, K^+)-ATP-azei la subiecții antrenați fizic față de cei sedentari (147). În condiții de repaus fizic K^+ intraeritrocitar este crescut ($P < 0,01$) la atleți în raport cu lotul de control. Concentrațiile Na^+ și Mg^{2+}, ca și activitatea pompei (Na^+, K^+)-ATP-azice au fost similare la subiecții antrenați și neantrenați. Totodată, după efort la subiecții adaptați K^+ intracelular a scăzut ($P < 0,05$) și a fost acompaniat de o creștere minoră a Na^+. Activitatea (Na^+, K^+)-ATP-azei a crescut semnificativ ($P < 0,05$) după efort.

Scanned with OKEN Scanner

Diferențele funcție de originea etnică au suscitat mai multe cercetări. Astfel, la negri concentrația Na^+ intracelular este mai mare decît la albi, de vîrstă și masă corporală comparabile, K^+ însă nu diferă. Activitatea pompei Na^+-K^+ apare redusă la subiecții negri, cele mai semnificative deosebiri, confirmate de mai mulți autori, constau în reducerea cotransportului de Na^+-K^+ și contratransportului Li^+-Na^+ (97, 209, 340). Datele menționate au importanță în interpretarea modificărilor de transport cationic din cadrul hipertensiunii arteriale esențiale.

Toți factorii menționați, iar enumerarea nu este completă, complică interpretarea rezultatelor asupra transportului eritrocitar de Na^+-K^+.

4.5. Transportul eritrocitar de calciu

Studiul transportului Ca^{2+} la nivelul celulelor intacte întîmpină două dificultăți majore, care țin de accesul la concentrațiile citosolice de calciu liber și de abilitatea organitelor celulare de stocare a cationului, concomitent cu eliberarea sa foarte rapidă. Eritrocitele nenucleate de om și mamifere conferă o serie de avantaje, care le-au consacrat și în acest caz ca model experimental: a) lipsa organitelor face virtual Ca^{2+} liber; b) prin liză reversibilă este posibilă înlocuirea citoplasmei cu soluții de compoziție cunoscută; c) suprafața membranei se află în contact direct cu mediile de suspensie, fără complicațiile introduse de structurile interpuse; d) eritrocitul de om prezintă o pompă puternică de Ca^{2+} cuplată cu ATP, care asigură expulsia cationului printr-un mecanism comparabil cu cel existent la alte celule; e) metabolismul și rolul Ca^{2+} la nivelul eritrocitului de om prezintă o serie de caracteristici comparabile, într-o măsură, cu cele ale alter celule; f) Ca^{2+} intracelular pare dependent de compoziția lipidică a membranei eritrocitare și este implicat în menținerea formei celulare; g) modificările permeabilității pentru Ca^{2+} sau ale pompei de calciu fac parte din mecanismul de maturare a hematiei umane (102).

Datele obținute sînt și în acest caz numeroase. Ne vom limita la a menționa că nivelul calciului intraeritrocitar este în mod normal redus datorită permeabilității reduse a membranei pentru cation și intervenției directe a pompei de calciu, care, utilizînd ATP ca sursă de energie, transportă activ cationul în spațiul extracelular. La o concentrație de saturație a Ca^{2+} celulele transportă circa 10 milimoli pe litru de celule și pe oră, de 200—1000 de ori mai mare decît permeabilitatea pasivă pentru Ca^{2+}. Ca urmare, în condiții fiziologice, pompa menține un gradient de 10 000 de ori mai mare decît concentrația intracelulară de calciu, care are valoarea sub 4×10^{-7} M. ATP-aza pentru Ca^{2+}, deci pompa de calciu, este dependentă de prezența ionilor Mg^{2+} liberi și de pH. Ea prezintă două locuri de legare pentru ATP, cu afinitate foarte diferită. Situsurile de legare pentru ATP și Mg^{2+} sînt situate pe fața internă a membranei, de aceea veziculele eritrocitare inversate reprezintă un model ideal de studiu (277). Proteina „pompă" este fosforilată rapid la 0°C de ^{32}P-ATP sub influența Ca^{2+}, mai intens decît este fosforilată proteina pompă de Na^+ sub influența Na^+. Tentativele de izolare ale Ca^{2+}-ATP-azei sînt avansate, proteina monomerică avînd o greutate moleculară de 130—140 000 daltoni. S-a demonstrat că afinitatea sa depinde de prezența calmodulinei (263).

Scanned with OKEN Scanner

Recent s-a probat o reducere a transportului de Ca^{2+} în absența anionilor permeanți, ceea ce pune la îndoială caracterul electrogen al sistemului (277).

Există o dependență de Ca^{2+} a transportului de K^+, pusă în evidență clasic prin „efectul Gardos": hematiile incubate în plasma proprie, în prezența adenozinei și a acidului acetic, prezintă o scădere accentuată selectivă a ionilor de K în prima oră de incubare. Pentru producerea efectului este necesară prezența Ca^{2+}; dimpotrivă efectul dispare dacă se adaugă, în exces, un agent chelator de Ca^{2+}. Ulterior, efectul a fost descris ca având o desfășurare secvențială: a) depleția de ATP, precondiție pentru pătrunderea Ca^{2+} în celule; b) pătrunderea Ca^{2+}; c) interacțiunea între calciul intern ionizat și procesul de pătrundere prin canale a K^+; d) activarea canalelor de K^+. Mecanismul permeabilității induse de Ca^{2+} apare extrem de selectiv pentru K^+ în raport cu Na^+, dar explicarea sa satisfăcătoare depinde de avansul, în perspectivă, al cunoașterii structurii și proprietăților canalelor de K^+ (194). S-a demonstrat participarea calmodulinei în controlul transportului de K^+ dependent de Ca^{2+}, prin efectul inhibitor exercitat asupra acestuia de mai mulți inhibitori ai calmodulinei, la nivelul globulelor roșii intacte (8).

Fig. VII. 30 — Depozite eritrocitare de calciu, puse în evidență la microscopul electronic prin metode citochimice. Fig. 1, de sus (× 36 000) depozite de Ca^{2+} localizate exclusiv la nivelul membranei eritrocitare. Fig. 2, de jos: (× 68 000, ca și următoarele) a) hematii spălate; b) hematii spălate și stocate 20 minute în mediu cu ionoforul pentru calciu, A23187; c) hematii din sînge venos proaspăt; d) circa 20% dintre hematiile spălate, examinate în detaliu prezintă mici depozite distribuite neordonat, la nivelul citoplasmei (După M. Borgers și colab., 1983) (42).

Interacțiunea Ca^{2+} cu sistemele de transport este, de fapt, mult mai complexă. Astfel, s-a pus în evidență un efect inhibitor al Ca^{2+} și asupra pompei Na^+—K^+, mai accentuat în cazul celulelor excitabile. Se încearcă explicarea fenomenului prin diminuarea nivelului de ATP, utilizabil în cadrul pompei de Ca^{2+} (50).

Scanned with OKEN Scanner

Ţinînd seama de implicarea certă a calciului în reglarea formei hematiei şi a deformabilităţii acesteia (prin controlul organizării şi proprietăţilor biofizice ale reţelei spectrină-actină, ca şi al dispunerii lipidelor în membrană) devine necesară cunoaşterea distribuţiei cationului în eritrocitul normal. Prin metode citochimice (tehnica fosfat-piroantimonat) s-a demonstrat prezenţa Ca^{2+} liber la circa 80% din eritrocite, sub forma unor mici depozite situate pe faţa internă a membranei, cu dimensiuni medii de 15 nm. În interiorul celulei nu au fost detectate precipitate, cu excepţia unei minorităţi de hematii, la care lipsind microdepozitele asociate membranei, au fost observate precipitate foarte fine, dispuse neordonat în membrană (fig. 30).

Inducerea deformării ireversibile a hematiilor de tip echinocit-sferocit, prin expunere la ionoforul A 23187 şi Ca^{2+} conduce la desprinderea precipitatelor legate de membrană. La celulele care nu au suferit nici o deformare se menţine o distribuţie normală a microdepozitelor. Dacă se tratează cu lizolecitină hematiile deformate reversibil, deci rămase în stadiul de echinocit, ele recîştigă Ca^{2+} legat la membrană. Aceasta ar putea proba legarea calciului la nivelul stratului intern lipidic al membranei, prin intermediul fosfolipidelor acide (42).

Vom mai menţiona demonstrarea faptului că ionii de Ca^{2+} acţionează ca mesageri intracelulari pentru răspunsul adrenergic, legat de fosforilarea benzii 2 (229).

4.6. Transportul glucoze

Studiul transportului hexozelor la nivelul hematiilor a condus la elaborarea conceptului de transportor mobil. Printre mamifere, hematiile primatelor prezintă o permeabilitate apreciabilă pentru hexoze. Iniţial, s-a constatat că această permeabilitate conducea la egalarea concentraţiilor între mediu şi celule. Cu toate acestea, diluţia unei suspensii de eritrocite într-o soluţie izotonă de glucoză nu antrenează hemoliză, aşa cum ar fi de aşteptat. Astfel, după o scurtă perioadă de penetrare rapidă, fluxul de glucoză se reduce considerabil, iar echilibrul necesită un timp extrem de lung în raport cu constanta de timp a fluxului rapid observat iniţial, sau cu cel măsurat în cazul unor concentraţii reduse de glucoză. Or, legile difuziunii simple — necomplicate prin modificările de volum — impun constante de timpi de echilibrare egali, indiferent de gradientele de concentraţie iniţiale.

O a doua deviere semnificativă de la predicţiile difuziunii simple a constat în observarea competiţiei între hexoze, în următoarea ordine de eficacitate: glucoză, manoză, galactoză, xiloză, arabinoză, sorboză şi fructoză. Devenea clar că transportul necesita o asociere tranzitorie cu un loc de legătură, prezent în cantitate limitată la nivelul membranei hematiei. Supoziţia a fost întărită prin descoperirea unor inhibitori specifici: fluorizina (glicozid) sau un derivat al său, fluoretina. Aceşti agenţi sînt capabili să inhibe atît fluxul cît şi influxul de hexoze, dar acţionează numai la suprafaţa membranei.

A urmat o serie amplă de studii a cineticii transportului, acompaniată de elaborarea unor modele variate pentru ca în ultimii ani să se producă progrese excepţionale în cunoaşterea transportului glucozei. Astfel, proteina din banda 4.5. a fost identificată ca transportor al monozaharidelor. Se demonstrează, ca şi în cazul transportului anionilor, că identificarea şi caracteri-

Scanned with OKEN Scanner

zarea proteinelor de membrane are o importanță primordială în descifrarea proceselor fundamentale de la acest nivel.

Membrana eritrocitului uman conține aproximativ 300 000 transportori independenți de glucoză și singurul constituent al acestor unități de transport apare a fi polipeptidul de 54 Kd. El este glicozilat eterogen și a putut fi reconstituit după extracția sa din membrană, păstrîndu-și capacitatea de transport pentru glucoză (220, 344). În identificarea receptorului a fost utilizată frecvent citocalazina B, inhibitor necompetitiv al transportului de glucoză la eritrocitele de om. Există argumente variate asupra asocierii monomerului în formă stabilă de dimeri și, probabil, de tetrameri în membrană, totuși numărul de monomeri constitutivi ai unității independente de transport nu a fost determinat (170, 344). Recent (1985) a fost izolată gena pentru transportul glucozei de la nivelul hepatocitelor iar compararea proteinelor hepatocitului și eritrocitului a condus la constatarea pronunțatei lor omologii, pînă la identitate (220). De aceea, devine posibil ca o singură specie de transportor al glucozei să reprezinte un component ubicuitar de la nivelul celulelor animalelor superioare. În această perspectivă posibilă, transportorul de glucoză devine un sistem excelent pentru studiul transportului moleculelor mici prin membranele biologice.

S-a demonstrat că legarea la nivelul transportorului este stereospecifică, D-glucoza legîndu-se preferențial, capacitatea de legare cea mai mică prezentînd-o L-sorboza și L-glucoza, monozaharidele cu transportul cel mai redus.

Procesul de transport constă într-o difuziune pasivă mediată de proteine și nu necesită consum de energie celulară. Trecerea monozaharidelor prin membrană este dirijată doar de gradientele de concentrație. Eficacitatea sis- ului de transport a fost ilustrată clar prin compararea coeficienților D-glucozei la traversarea straturilor lipidice sintetice și a membranei eritrocitare. Astfel, pe membranele artificiale, datorită naturii hidrofobe a interiorului dublului strat lipidic, coeficienții de permeabilitate ai D-glucozei sînt extrem de scăzuți (de ordinul 10^{-9}—10^{-10} cm $\cdot s^{-1}$). Pentru eritrocitele intacte, datorită intervenției transportorilor specifici, coeficienții sînt de ordinul 10^{-4} cm $\cdot s^{-1}$ (170).

Principalele aspecte care se cer clarificate în continuare sînt următoarele: a) controlul comportării ambelor locuri de transport, de pe fețele internă și externă, pe parcursul ciclului de transport; b) determinarea precisă a ecuațiilor cinetice care descriu ciclul de transport; c) investigarea schimbărilor structurale ale situsurilor de transport, care se produc pe toată durata procesului. Una din tehnicile cu ajutorul căreia s-ar putea clarifica aceste probleme este RMN. Astfel, prin analiza spectrelor ^1H RMN s-au obținut o serie de date cu privire la legarea β—d—glucozei pe locurile de transport ale transportorului eritrocitar de glucoză. Situsurile de transport există atît pe fața internă cît și pe fața externă a membranei. Citocalazina B, inhibitor competitiv și specific al locurilor de transport de pe fața internă a membranei, recrutează totalitatea situsurilor de transport, prin modificări de conformație la nivelul suprafeței interne celulare. Acest rezultat reprezintă un suport puternic în favoarea modelului cu un singur loc de legare, situsul de transport fiind expus alternativ pe fața internă sau pe cea externă ca urmare a modificărilor de conformație ale proteinei transportoare. Limitarea intensității

Scanned with OKEN Scanner

transportului se produce prin translocarea locurilor de transport între cele două conformații (336). Pe baza acestor date au fost elaborate o serie de modele.

4.7. Alte procese de transport de la nivelul membranei hematiei

Varietatea și versatilitatea proceselor de transport detectate la nivelul globulelor roșii este mult mai amplă decît datele cuprinse în secțiunile anterioare ale acestui capitol. Vom enumera, în continuare, doar cîteva exemple.

Pentru captarea eritrocitară a *colinei și a tetraetilamoniului* au fost descrise două mecanisme: difuziunea simplă și un sistem de transport saturabil. Captarea colinei este proporțională cu timpul pînă la 4 ore după incubare, concentrația intracelulară a acesteia reprezentînd o fracțiune redusă față de concentrația extracelulară. Este surprinzător faptul că transportul colinei apare corelat cu un substrat fiziologic, deoarece colina captată de eritrocite nu este încorporată în fosfolipide și nici nu este convertită în metaboliți. Acest transport apare mai curînd ca un vestigiu (207).

În cazul *anionilor organici* apare o dificultate a interpretării rezultatelor datorită liposolubilității parțiale și incompletei ionizări a acestor anioni. Cînd se caracterizează sistemul de transfer ionic trebuie efectuată o distincție între penetrarea anionilor organici și pătrunderea acizilor nedisociați. Aceasta, deoarece trecerea acizilor nedisociați neutri nu impune existența unei molecule receptor, ci depinde de solubilitatea compusului în faza lipidică a membranei. Distingerea celor două situații se obține prin diferite tehnici: rata hemolizei în săruri de amoniu, modificarea pH-ului extern și măsurarea schimbului net al anionilor organici extracelulari cu clorul celular. Din datele obținute rezultă că anionii organici nu trec prin difuziune liberă, ci prin interacțiune specifică cu un component al membranei (219). De aici probabilitatea că anionii organici și anorganici să fie transportați prin intermediul aceluiași sistem, ipoteză încă neconfirmată.

Transportul aminoacizilor a fost studiat extensiv la globulele roșii ale mamiferelor dar, în mod surprinzător, eritrocitul de om a fost neglijat. Ca urmare informațiile sînt fragmentare și limitate.

La nivelul eritrocitelor mamiferelor sînt cunoscute 4 sisteme de transport distincte, a căror prezență sau absență variază funcție de specie. În tabelul X sînt prezentate principalele caracteristici ale celor 4 sisteme. Se observă că la eritrocitele de om sistemul C lipsește, iar pentru aminoacizii neutri celulele prezintă două alternative: sistemul L care este selectiv pentru aminoacizii hidrofobi cu masă mare și sistemul alamină-cisteină, dependent de sodiu (353).

Captarea triptofanului de către hematiile umane este mediată pe două căi: un mecanism de transport selectiv saturabil cu afinitate mare și un mecanism cu afinitate redusă, mediat de sistemul L.

Aceste sisteme au rol important în funcțiile eritrocitare și în viabilitatea celulei, dar rolurile specifice nu sînt restrînse în cadrul particular al unui anumit sistem. Astfel, transportul intracelular pentru sinteza intracelulară de glutation este mediat la eritrocitele de oaie prin sistemul C, în timp ce sistemele L și alanină-cisteină-Na-dependent se combină funcțional la nivelul eritrocitelor de om. În mod similar, transportul de aminoacizi dibazici din

Scanned with OKEN Scanner

Sisteme de transport pentru aminoacizi la nivelul eritrocitelor de mamifere
(După J. D. Young și J. C. Ellory, 1979) (353)

Sistem	Specificitate	Parametri cinetici			Distribuția pe specii	Dependența de Na^+
		Aminoacid	K_m aparent (mM)	V_{max} (mM/l cel. pe oră)		
C	Aminoacizi neutri mici, de masă intermediară. Afinitate pentru aminoacizii dibazici. Stereospecific.	L-alanină L-cisteină L-lizină	19 14 50	10 9 —	Identificat pozitiv doar la oaie. Poate fi prezent și la alte specii. Absent la hematiile de om.	Nu
L	Aminoacizii neutri cu masă mare; afinitate redusă pentru aminoacizii neutri mici. Parțial stereospecific	L-leucină L-alanină L-cisteină	4,8 50 50	68 — —	Prezent la om, iepure, șobolan. Nedetectat la rumegătoare și pisică.	Nu
Alanină-cisteină-Na-dependent	L-alanină; L-cisteină, posibil glicină. Stereospecific.	L-cisteină	0,02	0,03	Prezent în hematiile de om, dar absent la oaie.	Da
L_i (L_y)	Aminoacizi dibazici; stereo-specific.	L-lizină L-arginină	0,03 0,09	0,44 0,40	Detectat la om, iepure și pisică. Absent la eritrocitele de oaie.	Nu

eritrocitele de oaie survine prin sistemul C, în timp ce alte specii posedă un sistem specific pentru acești aminoacizi (353).

Glutationul (GSH), tripeptid compus din cisteină, acid glutamic și cisteină, este un constituent major al eritrocitului, fiind considerat un factor vital în protecția celulei în modificările oxidative. El acționează, probabil, în prima linie în apărarea contra oxidanților ca H_2O_2. Grupul său — SH foarte reactiv poate funcționa în protecția membranei, hemoglobinei și a grupărilor — SH proteice (306). Durata sa de înjumătățire la eritrocitele de om este de 4 zile. Sinteza GSH se produce, probabil, în două etape, în prezența ATP, dar mecanismul degradării sale rămîne incert. La eritrocitele supuse stresului oxidativ, glutationul oxidat (GSSG) este expulzat activ, transportul necesitînd ATP și fiind inhibat de fluor. Această observație poate explica *turnover*-ul glutationului în globulul roșu. Există experimente care indică, la eritrocitele nesupuse stresului oxidativ, un transport extracelular de glutation, mai rapid decît degradarea observabilă a glutationului din celulă. Prezumptiv, acest transport reprezintă nivelul bazal al transportului rapid produs cînd nivelul GSSG este deosebit de crescut. Ultimul sistem a fost propus ca mecanism de apărare a eritrocitului împotriva schimbărilor oxidative extreme (199).

Scanned with OKEN Scanner

GSSG format în prezența oxidanților, atît enzimatic cît și neenzimatic, este particular toxic pentru celule. El se poate combina cu grupările SH ale proteinelor din membrană, alterînd astfel proprietățile acestora, cu hemoglobina și cu grupările -SH ale hemoglobinei, cînd produce alterarea structurii conformaționale a lanțului β. Analog, rezultă o inhibare a activității enzimelor (306). Devine astfel clar rolul protector al transportului rapid extraeritrocitar de glutation oxidat, la concentrații fiziologice extrem de lent.

Pentru explicarea transportului de aminoacizi la nivelul membranei eritrocitare au fost propuse mecanisme impunînd existența unui transportor, singur sau complexat cu aminoacizii. De dată recentă s-a susținut probabilitatea implicării unei fracțiuni proteice din membrană (233).

5. FORMA, DEFORMABILITATEA ȘI AGREGAREA ERITROCITARĂ

Cu aproape 30 de ani în urmă M. Nakao și colab. descopereau că ATP este implicat în menținerea formei normale biconcave a globulului roșu (225, 226). Astfel, dacă se producea o scădere a conținutului ATP sub un anumit nivel, discocitele își modificau profund forma, devenind crenelate. Studii ulterioare au confirmat aceste observații, astfel încît rolul ATP în prezervarea formei eritrocitare este susținut experimental foarte solid, multă vreme fiind considerat determinantul principal. Descrierea scheletului membranei a „complicat" explicațiile tradiționale.

Pentru medicul practician este importantă integrarea formei, deformabilității și agregabilității hematiilor în determinismul proprietăților reologice ale sîngelui.

Particularitățile reologice ale sîngelui au început să fie observate încă din secolul trecut de către J. Poiseuille, ulterior lucrările lui Fahraeus și Lindqvist probînd că vîscozitatea aparentă a sîngelui devenea cu atît mai mică cu cît diametrul vasului era mai redus. Timp îndelungat aceste fapte au fost acceptate și considerate ca atare, fără să se încerce explicarea lor aprofundată. În prezent, a devenit posibilă, deși persistă unele necunoscute, o analiză a fenomenelor la nivel molecular.

5.1. Forma eritrocitului

Forma eritrocitului este explicată prin confruntarea a două tendințe: a) utilizarea unor concepte din mecanică, exprimate în termenii de tensiune interfacială, stres și deformare; b) utilizarea datelor de biologie moleculară a celulei și considerarea formei eritrocitare ca un rezultat al interacțiunilor specifice dintre molecule.

Forma de discocit, însă, este caracteristică doar celulei în repaus, în stare staționară, condiție rarisimă deoarece în fluxul circulator eritrocitul suportă deformări considerabile (fig. 31). După îndepărtarea forțelor hidraulice, hematia revine rapid la forma biconcavă.

Scanned with OKEN Scanner

Prima tendință de explicare a formei s-a concretizat prin mai multe modele, interesante, dar criticabile, deoarece conceptele utilizate, aparținînd mecanicii macroscopice, nu sînt confirmate convingător în studiul mecanicii microscopice. Un macromodel popular aparține lui B.S. Bull (53), care a reușit să reproducă satisfăcător o serie de transformări sferă—disc, vizibile la eritrocit în cazul manipulărilor osmotice. Modelul constă dintr-o rețea sferică de hexagoane și pentagoane, avînd ca muchii tije cuplate cîte trei de un pivot,

Fig. VII. 31 — Fotomicrografie prin care se demonstrează clar deformarea globulelor roșii umane, la nivelul capilarelor cutanate, cu un diametru de circa 7 μm (După R. Skalak și P. I. Brånemark, 1969) (298).

astfel încît să se poată roti liber. Inclusă într-un înveliș de polietilenă, rețeaua ia o formă biconcavă imediat ce presiunea exercitată din exterior devine mai mare decît cea din interior. Se obține o formă asemănătoare cu a discocitului eritrocitar. S-a susținut intervenția unui mecanism similar în cazul determinării formei eritrocitare, proteinele integrale ale membranei fiind considerate echivalentul pivoților. Totodată, cînd presiunea din afara mediului în care este introdus sacul din polietilenă scădea lent, modelul își modifică forma într-o manieră analogă hematiei supusă la modificări osmotice.

Defectul modelului descris, comun și altor modele mecanice, constă în absența unui paralelism direct cu nivelul molecular, deci cu caracteristicile organizării moleculare și a interacțiunilor din membrana eritrocitară. Totuși, o serie de proprietăți ale suprafeței hematiei sînt, cel puțin parțial, explicate: a) modulii elastici ai membranei se află uniform distribuiți pe suprafață; b) natura de „mozaic fluid" a biomembranelor poate explica disiparea deformației de stres; c) extensia membranei mai mult de 8% în suprafață produce rupturi și hemoliză; d) volumul constant este o condiție a supraviețuirii hematiei; e) nu poate fi explicată rezistența la îndoire, pe care ulterior, B.S. Bull și J.D. Brailsford (53) au atribuit-o asimetriei distribuției lipidice, care are drept rezultat tendința la autocompresie a membranei. Deși confirmat ulterior și de alți autori, modelul prezentat trebuie strîns corelat cu caracteristice interacțiunilor moleculare ale membranei globulului roșu.

Regularitatea formei eritrocitului normal a tentat la realizarea unor modele matematice, chiar dacă pînă în prezent nu există o teorie cantitativă care să ofere o descriere, funcție de temperatură și compoziție, a ordonării fa-

Scanned with OKEN Scanner

zelor lipidice din membrană. Cele mai cunoscute modele de acest gen sînt: a) modelul inelelor al lui Cassini, constînd dintr-o serie de curbe cu proprietatea constanței produsului distanțelor dintre două puncte fixe; b) modelul picăturii de lichid, care propune pentru jumătate din secțiunea discocitului profilul unei picături de lichid ce se desprinde de la nivelul extremității inferioare a unui tub capilar.

Ambele modele reprezintă secțiuni transversale prin centrul geometric al eritrocitului. Pentru a obține corpul ce modelează celula, curbele trebuie rotite în jurul ordonatei graficului. Interesul acestor modele abstracte este posibilitatea simulării formei eritrocitare cu calculatorul. În laboratorul nostru, împreună cu studentul L. Cocea, au fost obținute o serie de rezultate pornind de la ecuațiile modelului Cassini.

A doua direcție în explicarea la nivel molecular a formei eritrocitului uman, după îndelungi reveniri și controverse, începe să capete un contur coerent. În perioada „clasică", deschisă M. Nakao și colab., care au atestat rolul ATP în menținerea formei biconcave a hematiei, au fost întreprinse numeroase studii cu ocazia cărora au fost detectate cu claritate un număr de etape în modificările de formă ale celulei. Acestea evoluează invariabil în două direcții: a) forma echinocitară, cînd hematiile prezintă spiculi; b) forma stomatocitară, cînd globulele roșii devin uniconcave. Pentru ambele transformări au fost stabilite stadii convenționale, cele mai cunoscute studii fiind întreprinse de N. Mohandas și C. Feo (215). Ei au reușit stadializarea variațiilor de formă prin creșterea progresivă în mediul de incubare a hematiilor, a numărului de molecule ale unui derivat anionic de fenotiazină pentru echinocitoză și, respectiv, ale unui derivat cationic de fenotiazină pentru stomatocitoză. În ambele cazuri deformările sînt reversibile după reincubarea hematiilor în

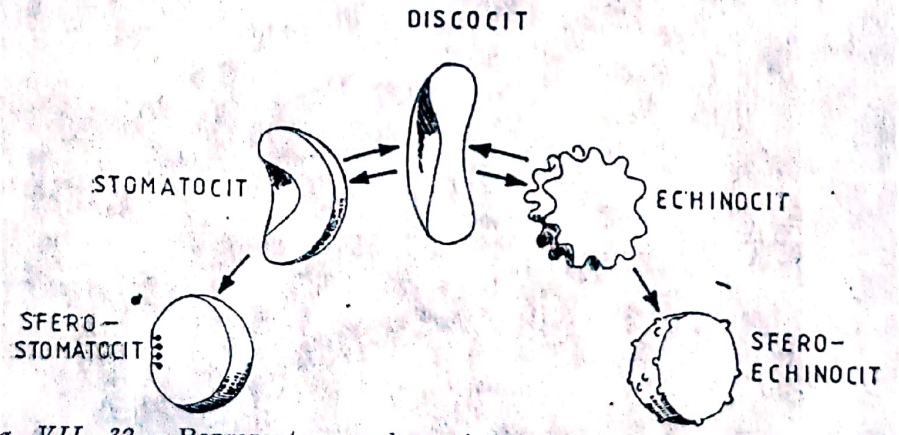


Fig. VII. 32 — Reprezentarea schematică a transformării discocit-stomatocit și discocit-echinocit (După M. Bessis, 1973) (31).

mediu fiziologic, după cum în ambele situații dacă se crește în continuare concentrația moleculelor agentului deformant se ajunge la sferocitoză. Sferocitul reprezintă o deformare ireversibilă, care se încheie cu distrugerea hematiilor (hemoliză). Nu trebuie să se considere schimbarea de formă ca necesară în procesul de eliberare a hemoglobinei, deoarece hemoliza se poate produce și fără modificarea globulului roșu.

Deoarece vom face frecvent apel la diferitele denumiri ale alterării formei eritrocitare, vom menționa că M. Bessis este cercetătorul care a clasificat rațional variatele deformări ale hematiei (fig. 32). Astfel, în transformarea

Scanned with OKEN Scanner

„discocit-echinocit" se recunosc următoarele 5 stadii: echinocit I (discocit cu contur neregulat); echinocit II (globul roșu turtit, cu spiculi); echinocit III (globul roșu cu 30—50 spiculi); sfero-echinocit I (o sferă cu mulți spiculi mici, spiculii mari, observați anterior fiind eliberați sub formă de microvezicule); sfero-echinocit II (o sferă cu spiculi prea mici pentru a fi observați la microscopul optic (fig. 33,34). În transformarea „discocit-stomatocit" se recunosc 4 stadii: stomatocit I (eritrocitul devine uniconcav, avînd formă de cupă, sau ceașcă); stomatocit II (eritrocitul are formă de cupă, dar cu adîncitura mai mare); sfero-stomatocit I (stomatocit cu o depresiune centrală minimă, realizînd aproape o sferă); sfero-stomatocit II (sferă cu unele

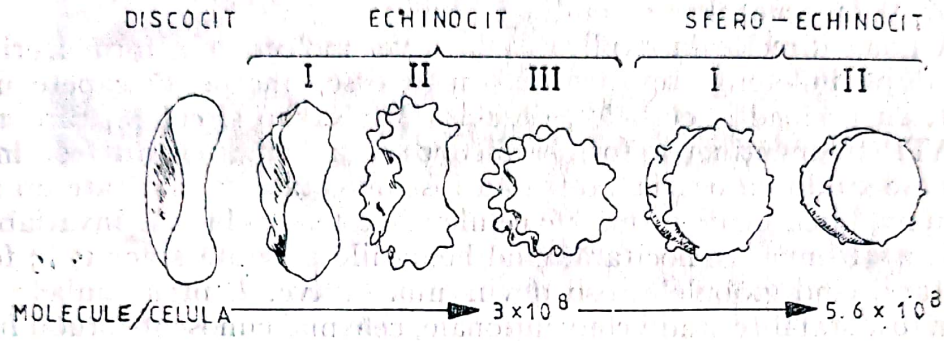


Fig. VII. 33 — Diferitele etape ale transformării discocitului eritrocitar normal în sfero-echinocite. Este menționat numărul de molecule ale unui derivat anionic al fenotiazinei, necesar pentru obținerea fiecăreia dintre aceste forme (După N. Mohandas și C. Feo, 1975) (215).

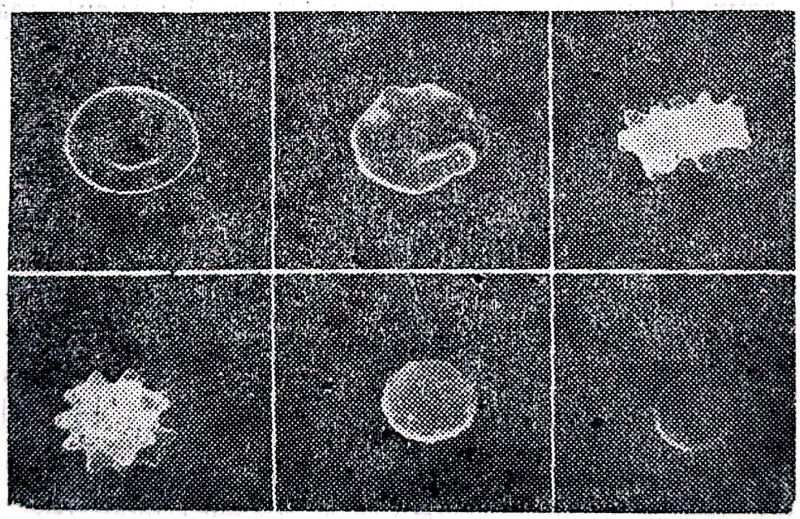


Fig. VII. 34 — Stadiile clasice ale transformării discocit eritrocitar-echinocit observate la microscopul electronic cu baleiaj (După P. L. La Celle și colab., 1976) (186).

neregularități ce nu pot fi observate decît cu microscopul electronic) (fig. 35,36). În realitate, gama deformărilor globulului roșu este mult mai mare, descriindu-se în afara celor menționate anterior și altele ca: acantocit, codocit, dacriocit, drepanocit, eliptocit, keratocit, knizocit, leptocit, schizocit, sferocit, torocit. Se mai pot descrie forme mixte: sfero-schizocit, sfero-echinocit, sfero-stomatocit, echino-acantocit și stomato-acantocit.

Scanned with OKEN Scanner

Descriem succint formele atipice cel mai frecvent întîlnite: a) eliptocitul prezintă formă eliptică în loc de formă circulară; se întîlnește în ovalocitoze, de origine ereditară; în eliptocit conținutul de hemoglobină este de obicei redus; b) leptocitul are diametrul longitudinal crescut, grosimea crescută și volumul normal; forma discoidală este păstrată, dar cele două concavități sînt mai puțin accentuate și mai întinse; cauza platocitozei s-ar datora unei disproporții între cantitatea de hemoglobină și volumul normal al stromei,

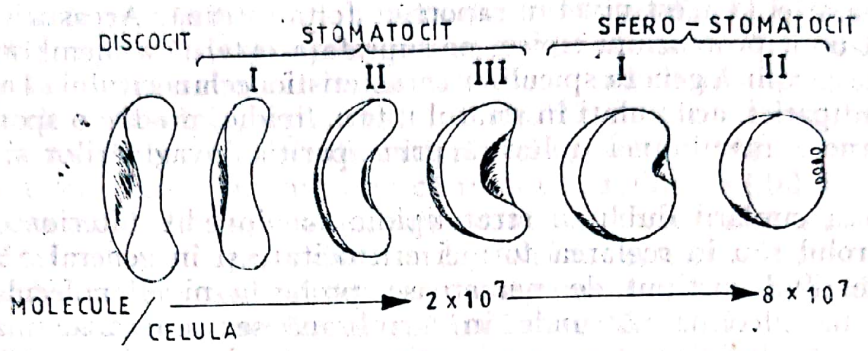


Fig. VII. 35 — Etapele transformării discocitului eritrocitar în sferostomatocit. Este indicat numărul de molecule al unui derivat cationic al fenotiazinei, necesar pentru obținerea fiecăreia dintre aceste forme (După N. Mohandas și C. Feo, 1975) (215).

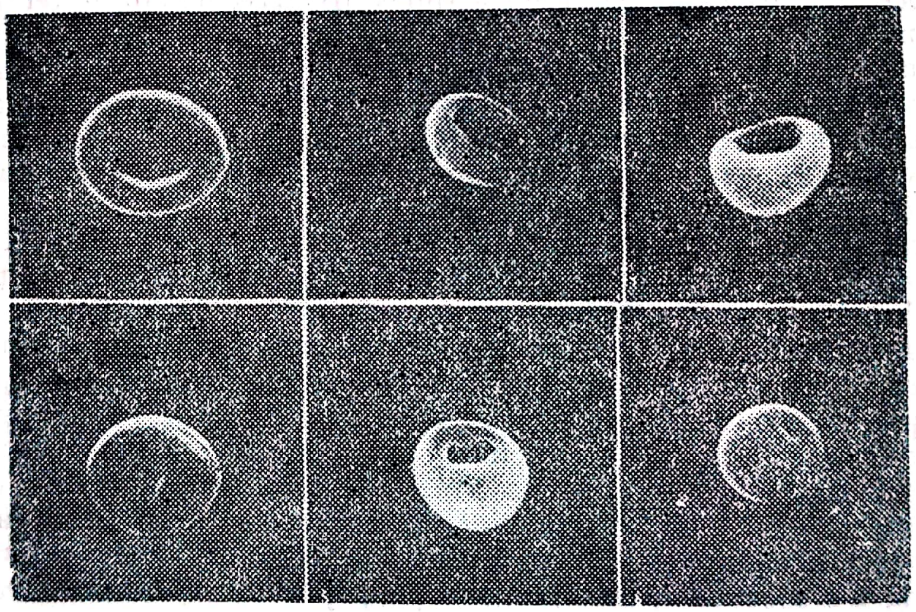


Fig. VII. 36 — Studiile transformării discocit eritrocitar-stomatocit puse în evidență prin microscopie electronică cu baleiaj (După P. L. La Celle și colab., 1976) (186).

care s-ar adapta la acest conținut redus; c) drepanocitul are formă de seceră, determinată de polimerizarea patologică a hemoglobinei, cu dispoziția ei în bastonașe helicoidale; d) poikilocitele reprezintă forme eritrocitare neclasificabile, fiecare eritrocit patologic avînd un aspect diferit, ceea ce face imposibilă determinarea diametrelor; poikilocitoza traduce o stimulare intensă și patologică a eritropoiezei.

Scanned with OKEN Scanner

După descoperirea alterărilor de formă consecutive depleției metabolice s-a constatat că aceleași modificări pot fi induse de către o serie de agenți anionici amfifili. Pentru exemplificarea transformărilor determinate de moleculele amfifile, M.P.Sheetz și S.J. Singer au formulat ipoteza dublului strat cuplat, conform căreia forma celulei rezultă funcție de ariile relative ale foițelor lipidice internă și externă ale membranei. Substanțele anionice amfipatice, intercalate exclusiv în foița externă a dublului strat lipidic, produc o creștere a ariei la acest nivel în raport cu foița internă. Aceasta va conduce la apariția unor protruziuni tipice, pe suprafața externă a membranei eritrocitare; așa se explică geneza spiculilor caracteristici echinocitului. Dimpotrivă, cationii amfipatici, acumulați în stratul intern lipidic, produc o sporire a ariei foiței interne a membranei, relevată prin apariția invaginărilor și stomatocitoză.

Ipoteza cuplării dublului strat lipidic s-a dovedit ulterior extrem de inspirată, rolul său în reglarea formei eritrocitare și în general a alterărilor morfologice fiind susținut de numeroase probe la nivel molecular. Astfel, cînd lizofosfatidilcolina pătrunde in membrană se va localiza mai întîi la nivelul stratului lipidic extern și ca urmare va rezulta echinocitoză; prin redistribuirea sa ulterioară atît în foița lipidică externă cît și în cea internă celulele revin la forma normală de discocit. În continuare, dacă fracțiunea din foița externă a lizofosfatidilcolinei este extrasă cu albumină, se va produce stomatocitoză. Aceasta, deoarece fracțiunea fixată la nivelul foiței interne nu a fost îndepărtată (190).

După descrierea amănunțită a citoscheletului membranei, mulți cercetători au fost tentați să considere această structură determinantul major, dacă nu exclusiv, al formei eritrocitare. Astfel, s-a demonstrat că vîscozitatea membranei și mobilitatea laterală a componentelor, în speță a proteinelor, este reglată de acest complex molecular (132).

Prin studiul efectelor Mg^{2+}-ATP și fosfatazei asupra fantomelor eritrocitare s-a conchis implicarea fosforilării spectrinei în alterarea rețelei citoscheletului (35), prin fenomene de agregare-dezagregare ale acesteia. Deoarece fosforilarea-defosforilarea proteinelor este recunoscută de mult timp ca un mecanism important în controlul activităților metabolice, este posibil ca același proces să opereze la nivelul membranei eritrocitare. Membrana hematiei conține ambele tipuri de proteinchinaze, atît cea cAMP-dependentă cît și cea independentă. Fosforilarea spectrinei este catalizată de enzima cAMP-independentă (156). Studii pe celule intacte marcate cu (^{32}P) ortofosfat, sau pe fantome incubate cu (^{32}P)ATP au arătat doar o fosforilare a unei subunități din banda 2 a spectrinei, corespunzînd polipeptidului CNBr de 1900 daltoni (35). Rămîne să se confirme fosforilarea și *in vivo*.

Din experimentele menționate rezultă că modificările metabolice ale formei sînt legate de fosforilarea proteinei structurale majore, spectrina, pe calea chinazei cAMP-independentă, acționînd în opoziție cu fosfataza. În acord cu acest model, defosforilarea spectrinei ar provoca o rearanjare a citoscheletului și contracția foiței interne a membranei, cu formarea consecutivă de echinocite. Ulterior însă, o serie de experimente nu au confirmat această supoziție. Astfel, s-a observat că echinocitoza precedă evident defosforilarea spectrinei în celulele intacte, iar diferitele niveluri ale Mg^{2+}-ATP pot să producă modificări de formă ale fantomelor chiar după extragerea integrală a chinazei din membrana eritrocitară (10, 242). Cînd fantomele sînt

Scanned with OKEN Scanner

spălate la 0°C cu o soluție de NaCl 0,5 M pentru îndepărtarea din membrană a proteinchinazei cAMP-independentă, ele prezintă în continuare modificări de formă dependente de ATP. Se constată chiar și o extrem de redusă fosforilare a spectrinei, care ar putea fi atribuită autocatalizei (160).

A surprins asemănarea formei și proprietăților fantomelor, ca și a citoscheletului izolat prin extracția membranei cu detergenți neionici, cu globulele roșii din care derivă. De aceea, considerarea scheletului membranei ca suport al controlului formei eritrocitare a persistat pînă recent (326). Totuși, și mai recent (1982) au fost aduse argumente în favoarea acomodării pasive a citoscheletului la forma membranei. În acest sens, scheletul membranei este o rețea elastică și flexibilă, care poate adopta și stabiliza forma membranei celulare, dar nu poate inițiia modificări morfologice (189,190).

Opinia prevalentă curentă este că ipoteza cuplării dublului strat lipidic reprezintă cea mai bună explicație pentru controlul formei globulului roșu (15). Desigur, că și în acest caz, explicația la nivel molecular trebuie completată. Există o serie de date care pot reprezenta argumente mai subtile ale ipotezei. Astfel, mai demult s-a observat că atît încărcarea cu calciu cît și depleția de ATP provoacă echinocitoză, ambele situații conducînd și la creșterea nivelului de diacilglicerol în membrană (5). Ulterior s-a demonstrat activarea de către Ca^{2+} a fosfodiesterazei membranare, care degradează polifosfoinozitidele (fosfatidilinozitol 4-fosfat, PI-P și fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat, PI-PP) în diacilglicerol (5). În absența ATP, activitatea fosfodiesterazei se reduce prin pierderea de grupări fosfat, ceea ce are ca efect „strîngerea", micșorarea ariei foiței interne a membranei. Recent (1984) s-a probat în modificările formei hematiei induse prin depleția de ATP, o conversie paralelă a PI-PP și a acidului fosfatidic către fosfatidilinozitol (PI) și, respectiv, diacilglicerol (103). Aceste rezultate sugerează că echinocitoza metabolică poate fi cauzată de reducerea ariei foiței interne lipidice a membranei, în acord cu ipoteza cuplului dublului strat.

Un alt mecanism de control al formei, bazat în fond pe aceeași ipoteză, a fost propus recent (1984). Astfel, prin utilizarea fosfolipidelor conținînd marcheri de spin s-a observat că fosfotidilserina și fosfatidiletanolamina, dar nu și fosfatidilcolina, după încorporarea în membrană sînt transportate rapid în foița internă. Deoarece procesul este dependent de ATP se consideră că în globulele roșii operează un mecanism activ reglat enzimatic pentru menținerea echilibrului ariei celor două foițe, condiție necesară pentru menținerea formei discoidale (282).

Colaboratorii lui M. Nakao propun și ei de dată recentă (1984) un model sensibil diferit. Prin utilizarea fantomelor eritrocitare resigilate, ei au observat două etape ATP-dependente în modificarea formei, una lentă și alta rapidă. Procesul lent se poate produce, prin adăugarea de ATP, chiar la 6°C. De aceea s-a conchis că fosforilarea proteinelor și efectul noncovalent al ATP sînt necesare pentru alterarea formei. S-a mai observat că degradarea proteolitică a ankirinei, fără o alterare vizibilă a celorlalte proteine, conduce către o formă fixă a eritrocitului, neafectată prin depleție metabolică sau prin me-

Scanned with OKEN Scanner

dicamente. De aici, concluzia că ankirina joacă un rol important în controlul formei (167). Există și alte rezultate care întăresc această concluzie. Astfel, s-a observat că fragmentul citoplasmatic al benzii 3 inhibă dispariția ATP-dependentă a crenelării, dar nu și același proces ATP-independent. În acest caz se susține că fragmentul intră în competiție cu banda 3 intactă în legarea ankirinei, afectînd astfel ancorarea citoscheletului la membrană (62).

Cu aceste modele și ipoteze relative la mecanismul și controlul formei hematiei nu se poate considera că investigarea la nivel molecular a fost încheiată. Alte date noi vin să complice din nou explicațiile anterioare. Astfel, s-a demonstrat (1985) că membranele globulelor roșii conțin miozină și tropomiozină (108, 335). Se impune astfel reconsiderarea controlului formei, integrînd acest mecanism contractil, prezent în majoritatea, dacă nu în toate tipurile de celule.

5.2. Deformabilitatea hematiei

Deformabilitatea hematiei, termen preluat direct din engleză, este expresia proprietăților reologice ale hematiei. Acestea rezultă din asocierea la proprietățile viscoelastice ale membranei a proprietăților viscoelastice ale hemoglobinei (197, 315, 316). Gradul de deformare a hematiei în circulația sanguină este dependent atît de forțele care acționează în aceste condiții asupra celulei, cît și de proprietățile sale reologice intrinseci.

Forțele din exterior exercitate asupra eritrocitului sînt: a) constrîngerea exercitată de fluidul în care celula se află în suspensie (plasma sanguină); b) hematocritul, care acționează în favoarea alinierii eritrocitelor și provoacă o deformare prin îngrămădirea hematiilor.

În ceea ce privește deformabilitatea intrinsecă, ea se află sub dependența a doi factori biochimici majori: a) structura citoscheletului membranei; b) repartiția lipidelor în cadrul dublului strat. Dintre proteine, un rol fundamental îl au cu certitudine spectrina și actina, fapt confirmat de numeroase cercetări, inclusiv în cadrul unor stări patologice. Au fost avansate, în scopul explicării aprofundate, o serie de mecanisme biochimice: rolul concentrației de ATP, al Ca^{2+}, al 2—3 DPG (disfosfoglicerat) care ar reduce afinitatea spectrinei pentru actină etc.

Paralel cu parametrii biochimici, este posibilă individualizarea a trei mari parametri reologici celulari: a) viscozitatea internă; b) relația suprafață-volum (forma); c) proprietățile viscoelastice și moleculare ale membranei. Fiecare dintre acești parametri este legat, în mod mai mult sau mai puțin complex, de parametrii biochimici enumerați anterior. În esență, caracteristicile parametrilor reologici ai hematiei sînt următoarele: a) *Viscozitatea internă* depinde de concentrația corpusculară în hemoglobină, care este de circa 33 g la 100 ml hematii, ceea ce corespunde unei viscozități de circa 7 m Pa·s (milipascali·secundă). Această valoare a viscozității este relativ redusă

Scanned with OKEN Scanner

în raport cu concentrația mare a hemoglobinei, reprezentînd doar de 8 ori valoarea viscozității apei (88). Este posibil ca în interiorul hematiei Hb să posede proprietăți de tip cristal lichid, care ar determina o viscozitate internă reală încă și mai redusă, de ordinul 5 mPa·s. Pe lîngă concentrația corpusculară în hemoglobină, viscozitatea internă este influențată de asemenea, de starea fizico-chimică a moleculei, de pH și de presiunea parțială a oxigenului. b) *Relația suprafață-volum*, respectiv forma eritrocitară, a incitat la cuantificarea comportării elastice a membranei hematiei. Deocamdată, valorile obținute prezintă o dispersie mare, generată probabil de diversitatea metodelor experimentale. Pot fi considerați 3 moduli de elasticitate diferiți: un modul de elasticitate corespunzînd deformărilor cu menținerea constantă a suprafeței (legat probabil de citoschelet); un modul de elasticitate pentru deformările acompaniate de creșterea suprafeței (asociat foarte probabil cu dublul strat lipidic, deși este greu de precizat cum se pot diferenția variațiile induse de mărirea ariei foiței lipidice interne față de mărirea ariei foiței externe); un modul legat de deformările cu schimbarea curburii celulei (în cazul agregării în rulouri a eritrocitelor). Fiecăruia dintre aceste 3 tipuri de moduli de elasticitate li se poate asocia un modul de viscozitate (316). Deocamdată, încercările de evaluare a parametrilor enumerați rămîn imprecise, dar se speră la un progres metodologic. c) *Fluiditatea membranei* este expresia microreologiei moleculare. S-au obținut pînă în prezent prin evaluarea mobilității de translație și de rotație a lipidelor și a proteinelor din membrană, numeroase indicații asupra a ceea ce în mod obișnuit se numește fluiditatea membranei. Pentru hematie rezultatele publicate conțin valori ale „viscozității moleculare" ale membranei cuprinse între 0,6 și 6 poise la 25°C. Rezultatele diferite se explică prin probele și metodele utilizate, ca și prin faptul că majoritatea tehnicilor asigură accesul exclusiv la zona lipidică a membranei. În plus, pentru fantomele eritrocitare s-a demonstrat recent (1986) o reducere a viscozității membranei față de celulele intacte, la care se adaugă și influența procedeelor preparative (228). Acest parametru este influențat de numeroși factori ca: temperatura, interacțiunile lipide-ioni, proteine-lipide, lipide-lipide. Cea mai certă acțiune o exercită colesterolul. Astfel, prin creșterea raportului colesterol/lipide se observă o diminuare a fluidității și o reducere a deformabilității celulare, avînd în ultimă instanță ca efect o diminuare a vitezei de eliberare a oxigenului (fig. 37). Una din proprietățile vizibile ale fluidității hematiei constă în existența unei rotații a membranei în jurul hemoglobinei, asemenea unei șenile de tanc (*„tank tread motion"*). Această rotație permite transmisia forțelor de constrîngere exercitate asupra membranei, favorizează disiparea lor avînd rol activ de asemenea în adeziunea și agregarea hematiilor (105).

Este important de menționat că influența fluidității membranei se extinde asupra tuturor funcțiilor membranei. Vom examina succesiv corelația cu fluiditatea a principalelor funcții ale membranei: 1) *Funcția de barieră:* a) difuziunea pasivă, de exemplu difuziunea oxigenului prin dublu strat lipi-

Scanned with OKEN Scanner

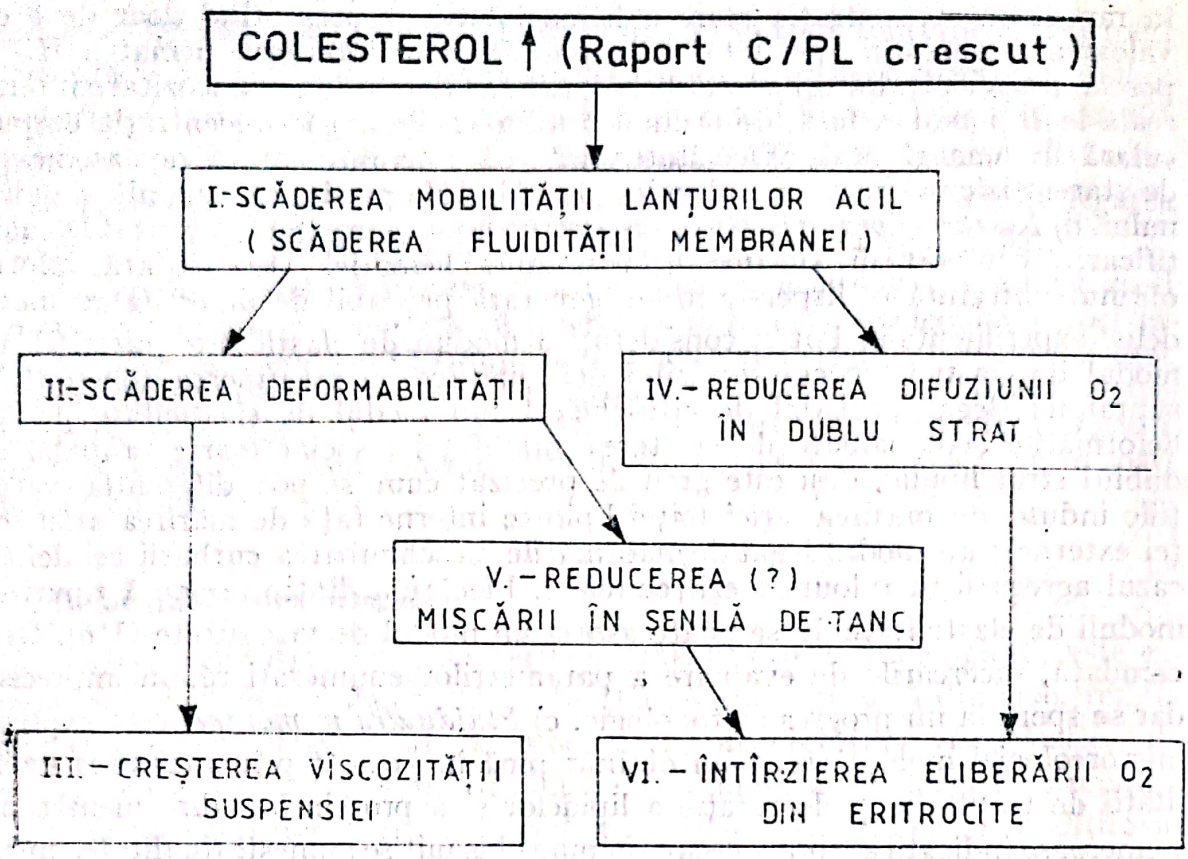


Fig. VII. 37 — Efectele creșterii concentrației colesterolului (și, deci, a raportului colesterol/fosfolipide) asupra fluidității membranei eritrocitare și, prin aceasta, asupra deformabilității eritrocitului și a eliberării O_2 de către eritrocite (După J. F. Stoltz, 1985) (316).

TABEL XI

Funcțiile eritrocitare, fenomenele subcelulare și compoziția biomembranelor. Deși fluiditatea membranei reprezintă un determinant al proprietăților reologice, influența sa se extinde asupra tuturor funcțiilor membranei globulului roșu (După T. Shiga și N. Maeda, 1980) (290)

Funcții celulare	Fenomene subcelulare (sau supramoleculare)	Compoziție
Reologie — viscozitatea suspensiei — deformabilitate	Fluiditatea membranei Viscozitatea intracelulară	Lipide: colesterol, fosfolipide Proteine: enzime transporturi hemoglobină
Durata de viață Transport de oxigen Răspunsuri ale suprafeței — imunologic — agregare — fuziune	Activitatea metabolică Alosteria hemoglobinei Formă	Metaboliți: 2,3-DPG ATP etc. Ioni: H^+, K^+, Ca^{2+} etc. Hidrocarbonate etc. (Medicamente)

Scanned with OKEN Scanner

dic, depinde de compoziția și stările membranare; de aceea, ca se reduce dacă va crește colesterolul; b) transportul mediat prin transportori poate fi afectat prin alterarea fluidității membranei; de exemplu, activitatea transportorului de glucoză din veziculele reconstituite depinde de fluiditatea membranei. 2) *Activitatea enzimelor din membrană:* difuziunea rotațională și laterală, modificările conformaționale, fenomenele de asociere-disociere ale proteinelor din membrană sînt influențate prin modificarea interacțiunii lipide-proteine. Dacă activitățile proteinelor, ca enzime sau transportori, vor fi modificate funcție de fluiditatea membranei, se vor produce consecutiv schimbări ale metabolismului celular. Consecutiv vor varia concentrațiile intracelulare de ATP, 2,3-DPG, ioni anorganici, ca și pH-ul. 3) Starea *suprafeței celulare*: modificările fluidității membranei pot influența răspunsurile imunitare (împreună cu alți factori de control), ca și abilitatea de agregare a celulelor, interacțiunea cu proteinele plasmatice și capacitatea de fuziune. Pot surveni schimbări în încărcarea electrică a suprafeței. Pe de altă parte, la nivelul suprafeței interne a membranei, interacțiunile dintre rețeaua citoscheletică și celelalte componente ale membranei pot fi afectate de variațiile fluidității membranei (43, 290). Rezultă că funcțiile celulare și subcelulare ale eritrocitului sînt strîns legate de fluiditatea membranei. Relații analoge există la nivelul tuturor tipurilor celulare.

Din cele prezentate anterior, rezultă că explicarea deformabilității hematiilor beneficiază de o explicație satisfăcătoare la nivel molecular. Concomitent, se poate accepta că, de fapt, acest termen este global, definind o proprietate care este de fapt suma unor evenimente și proprietăți moleculare distincte de la nivelul globulului roșu (tabel XII).

TABEL XII

Determinanți ai deformabilității eritrocitare

I — *FORȚE DIN EXTERIORUL HEMATIEI:*
- a) constrîngerea exercitată de mediul de suspensie (plasma);
- b) hematocritul;
- c) caracteristicile vaselor sanguine (îndeosebi capilare și sinusuri splenice).

II — *DEFORMABILITATEA INTRINSECĂ A HEMATIEI:*

A — *Factori biochimici majori:*
- a) citoscheletul membranei;
- b) repartiția lipidelor în dublul strat

B — *Alți factori biochimici:*
Ca^{2+}; ATP; agenți oxidanți ai Hb ce produc forme activate ale O_2: O^-_2, OH; H_2O_2; agenți oxidanți ai grupărilor SH.

C — *Parametri biofizici (reologici) ai hematiei:*
- a) viscozitatea internă (Hb);
- b) relația suprafață-volum (forma);
- c) fluiditatea membranei.

Notă: Factorii biochimici au fost prezentați în secțiunile anterioare ale capitolului.

Scanned with OKEN Scanner

Capacitatea de deformare a hematiei se modifică într-un număr foarte mare de boli; alterarea avînd un rol direct în patogenie sau în apariția unor complicații. Măsurarea deformabilității hematiei poate fi, deci, utilă în clinică și a devenit, de altfel, un parametru investigat în mod curent. Pe de altă parte, devine posibilă modularea deformabilității prin intermediul unor medicamente.

Metodele de măsurare a deformabilității sînt numeroase, iar în prezent se tinde la „rafinarea" acestora pînă la detectarea unor modificări minime (179). O investigare mai subtilă ar trebui să vizeze direct factorii moleculari implicați în determinarea deformabilității, dar pentru moment o asemenea posibilitate o au doar cercetătorii. Principalele tehnici utilizate în evaluarea deformabilității eritrocitare sînt următoarele: 1) *Măsurări ale viscozității* în viscozimetre capilare și rotative, în acest caz evaluarea fiind indirectă. Creșterea viscozității unei suspensii eritrocitare poate fi nu numai efectul scăderii deformabilității, dar și al creșterii agregabilității hematiilor. 2) *Determinarea geometriei eritrocitului în cîmpuri de forfecare definite;* în acest caz se utilizează, cel mai des, doi cilindri concentrici. Între cilindrul fix (stator) și cilindrul mobil (rotor) există un spațiu în care sînt plasate globulele roșii. Prin rotirea cilindrului mobil hematiile vor fi etirate, iar deformarea lor este cuantificată prin difracția unui fascicul de radiație laser. Dispozitivul a fost denumit ectacitometru (ectacitometrie). Un dispozitiv conceput pe baza aceluiași principiu este reoscopul, descris anterior. 3) *Aspirarea prin micropipete.* În acest caz se utilizează tuburi capilare cu diametrul de circa 1 μm, la nivelul cărora se aplică o presiune negativă mare, nefiziologică (5×10^4 Pa). Este necesară examinarea unui număr reprezentativ de celule, metoda neavînd șanse pentru utilizarea în investigațiile de rutină. 4) *Determinarea densității agregatelor de globule roșii după supunerea la forțe definite.* de obicei după centrifugare. Pe lîngă faptul că stresul de presiune aplicat este nefiziologic, sedimentarea este influențată de capacitatea de agregare a hematiilor. 5) *Filtrarea eritrocitelor în condiții bine determinate* a generat grupul cel mai amplu de metode, dintre care unele au pătruns în practica clinică curentă. Alternativa cea mai simplă constă în trecerea unei suspensii de hematii în soluție tampon fiziologică (hematocritul fiind de circa 8%) printr-un filtru de policarbonat. Filtrul prezintă pori, cu un diametru cunoscut (3 sau 5 μm), generați prin bombardament radioactiv. Traiectul porilor este perpendicular la planul filtrului, iar densitatea porilor este cunoscută. Prin măsurarea timpului de trecere al unui volum dat de sînge se poate calcula indicele de filtrabilitate. Ne vom referi pe scurt la acest indice, deoarece reprezintă parametrul cel mai caracteristic al procesului de filtrare.

Suspensia eritrocitară trece prin hîrtia de filtru sub acțiunea presiunii datorate greutății proprii. Cum această presiune este în orice moment proporțională cu nivelul rezidual al lichidului, curba volumelor filtrate funcție de timp respectă ecuația: $V_f = V_i(1 - e^{-ckdt})$, unde V_f reprezintă volumul filtrat în timpul t; V_i este volumul inițial; c este constanta geometrică a suprafeței de filtrare; k, constantă caracteristică procesului de filtrare; d este greutatea specifică a sedimentului eritrocitar și t timpul în minute (324).

Fiecare curbă este perfect caracterizată de constanta k. Este totuși mai practică prezentarea acestui parametru sub o altă formă, ca de exemplu timpul de semifiltrare; $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$. Timpul de semifiltrare reprezintă timpul necesar

Scanned with OKEN Scanner

pentru ca jumătate din suspensia eritrocitară să traverseze hîrtia de filtru. Acest timp poate fi aflat ușor prin lectura curbei obținută pe coordonate semilogaritmice, raportînd valorile V_f la timpul t. În sistemul de reprezentare semilogaritmic, diferențele de viteză ale filtrării diverselor suspensii eritrocitare apar ca diferențe de pantă ale curbelor de filtrare și sînt proporționale cu logaritmul lui $T_{1/2}$. Calculînd logaritmul zecimal al timpului de semifiltrare, se obține indicele de filtrabilitate pT, cel mai caracteristic parametru al procesului de filtrare: $pT = \log T_{1/2}$.

O variantă a tehnicii de filtrare constă în măsurarea presiunii necesare pentru obținerea unui debit constant. Existența unor variante metodologice face dificilă în prezent stabilirea unor constante caracteristice deformabilității normale a hematiilor.

Prin cea mai recentă tehnică se măsoară deformabilitatea unei singure hematii care traversează o membrană cu un por unic (*„Single Erythrocyte Rigidometer"*).

În prezent, cea mai disponibilă metodă pentru practica medicală curentă este următoarea: se măsoară timpul de trecere a 0,5 ml hematii diluate în mediu tampon (hematocrit 1—2%) printr-o membrană Nucleopore cu porii de 3 μm, sub o presiune de aspirație egală cu 10 cm coloană apă. Timpul de filtrare este normal de 1 minut și crește îndeosebi în diabet și o serie de afecțiuni renale. Instrumentul se numește hemoreometru. O problemă încă nerezolvată este realizarea în cazul testelor de filtrare a unor condiții comparabile cu caracteristicile fluxului sanguin real, *in vivo* (73).

Chiar dacă reprezintă un parametru global, rezultat din caracteristicile biofizice ale hematiei, deformabilitatea eritrocitară este o mărime foarte utilă în practica medicală. Acest nou parametru tinde să dobîndească o mare importanță semeiologică și prognostică, de aceea nu poate fi ignorat de către clinicieni.

5.3. Agregarea eritrocitară

Se știe de mai mult timp că în sîngele normal, hematiile formează agregate sub forma unor rulouri (fișicuri) (fig. 38). Agregarea fiziologică este reversibilă, iar producerea sa în exces determină formarea unor conglomerate masive, patologice, fenomen denumit *„sludge"*.

Factorii moleculari determinanți ai agregării globulelor roșii nu sînt cunoscuți. Forfecarea locală și proprietățile intrinseci ale membranei sînt parametri de control (19). Creșterea pragului de dezagregare sau excesul de agregare conduce la formarea de agregate patologice. Se cunoaște, atît din cercetări mai vechi, cît și din practica clinică necesitatea prezenței în mediu de suspensie pentru producerea dezagregării, a fibrinogenului, globulinelor sau, în general, a unor macromolecule. Fibrinogenul are un rol determinant cert în coeziunea și talia rulourilor.

J. F. Stoltz, consideră că agregarea trebuie abordată drept expresia unui echilibru energetic între forțele de agregare și forțele de repulsie. Schematic, energia de agregare (sau de pontaj) între două celule adiacente (W_a) este proporțională cu numărul de molecule agregante prezente la suprafață (N_a) și cu energia elementară de agregare corespondentă (W_1), adică $W_a =$

$N_a \cdot W_t$. Acești termeni sînt abstracți și necesită o obiectivare moleculară precisă (216).

Pînă în prezent, cele mai numeroase experimente au fost efectuate cu dextran de diferite mase moleculare și cu fibrinogen. În cazul dextranului există două tipuri de legături care ar interveni în agregare. Prin utilizarea dextranului marcat cu tritiu (GM 77 600) s-a observat că adsorbția acestui polizaharid pe suprafața globulului roșu este în relație liniară funcție de concentrația în mediul de suspensie. Dextranul este un polimer neutru și de aceea, se presupune o adsorbție a sa prin forțe van der Waals sau legături de hidrogen. Dimpotrivă, pentru polilizină încărcată pozitiv afinitatea suprafeței

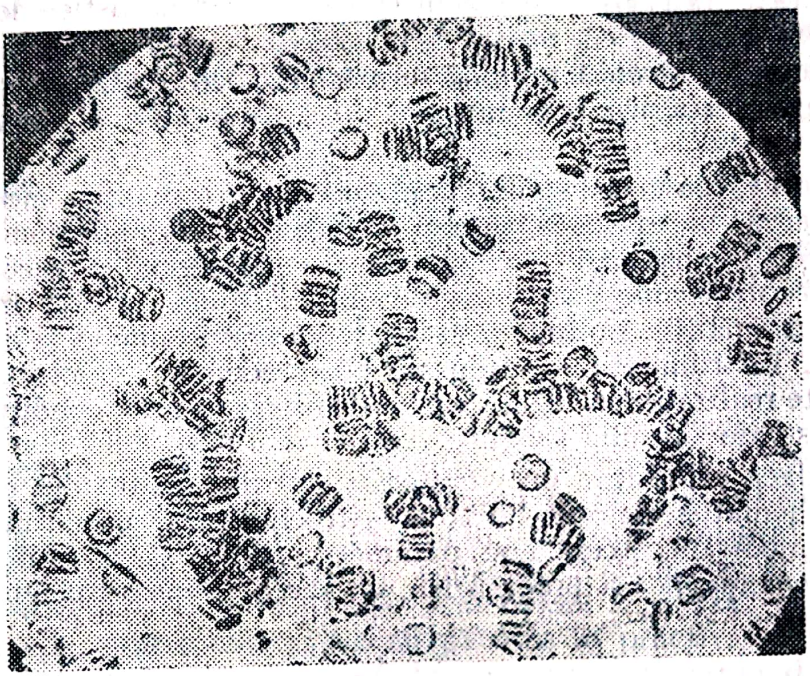


Fig. VII. 38 — Formarea de rulouri (agregare reversibilă) observată în sîngele unui subiect normal (După J. F. Stoltz, 1985)(316).

eritrocitare este mult mai mare, deoarece adsorbția se produce prin atracția electrostatică a grupărilor încărcate negativ, de la nivelul feței externe a membranei (66). Natura structurilor implicate în adsorbție nu este însă cunoscută.

Fiziologic, în afara prezenței fibrinogenului, agregarea hematiilor necesită și prezența unor fracțiuni globulinice, ori a altor molecule de dimensiuni comparabile. Prin utilizarea proteinelor plasmatice marcate cu ^{131}I s-a constatat adsorbția la nivelul suprafeței eritrocitelor a numeroase fracțiuni.

Este clar că agregarea reversibilă este determinată de legături nespecifice, spre deosebire de agregările specifice produse în cazul reacțiilor antigen-anticorp sau a lectinelor (concanavalină A).

Concomitent cu energia de agregare (W_a), există o altă serie de energii care se opun producerii fenomenului; a) energia electrostatică (W_e) dată de sarcinile de suprafață ale membranei (în principal ale acidului sialic), al cărei caracter repulsiv ține de faptul că hematiile prezintă, evident, sarcini de suprafață comparabile, de același semn (negative); b) energia mecanică (W_m)

Scanned with OKEN Scanner

dată de creșterea suprafeței membranei în momentul pontajului celulelor; c) energia mecanică (W_c) determinată de forfecarea din fluxul circular. Condiția de echilibru este: $W_t = W_a - W_e - W_m - W_c$.

Forțele de repulsie electrostatică pe unitatea de suprafață (P_e) pot fi calculate presupunînd suprafețele membranare în contact plane și cunoscînd potențialul de membrană, forța ionică și distanța dintre membranele celulelor învecinate. Cînd agregarea este produsă prin macromolecule încărcate pozitiv, sarcinile negative ale membranei vor servi ca locuri de legătură pentru grupările pozitive polimerice, ceea ce va conduce la diminuarea netă a forțelor de repulsie electrostatică.

Energia mecanică este reflexul alterării formei hematiilor dispuse în rulouri. Observații prin microscopie electronică au arătat o deformare a membranelor adiacente, deoarece suprafețele de agregare devin paralele (fig. 39). Distanța intracelulară este foarte variabilă, funcție de tipul de molecule utilizat, dar rămîne constantă pentru o moleculă dată. În cazul dextranului, de exemplu, distanțele intercelulare sporesc odată cu creșterea masei moleculare a polimerului (66).

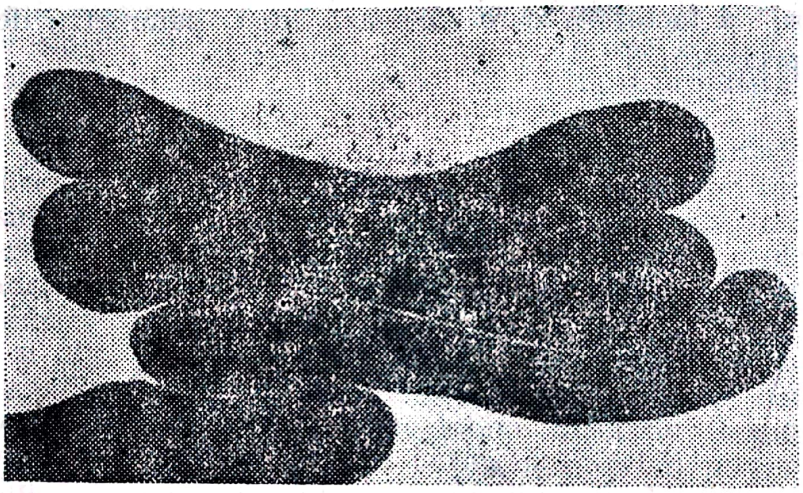


Fig. VII. 39 — Micrografie prin transmisie electronică a rulourilor de globule roșii (om) din plasmă. De observat suprafețele celulare paralele și distanța relativ uniformă dintre celule (După S. Chien, 1975)(66).

Forțele mecanice legate de forfecare pot fi studiate aplicînd restricții de forfecare cunoscute, iar relația dintre forța de constrîngere și gradul de separare a agregatelor eritrocitare este cuasiliniară (66, 298).

Agregarea globulelor roșii poate fi determinată prin diferite metode, cele mai utilizate fiind următoarele: 1) *Metode viscozimetrice*, pornind de la faptul că viscozitatea crescută a suspensiei eritrocitare la forțe de forfecare mici este dată de agregarea eritrocitară; la rate mari de forfecare metodele nu sînt utilizabile, deoarece viscozitatea sîngelui va depinde mai mult de deformabilitatea hematiilor, scăzînd prin deformarea elipsoidă a acestora. 2) *Metode de sedimentare*, utile în măsura în care viteza de sedimentare este corelată cu gradul de agregare al globulelor roșii. În realitate, mai intervin în sedimentare hematocritul și, mai puțin, viscozitatea plasmei. 3) *Observația directă*, în microcameră transparentă la microscop, ale cărei rezultate depind de viteza

Scanned with OKEN Scanner

fluxului și geometria camerei. 4) *Metode optice*, prin procedeul denumit silectometrie, cînd se măsoară reflexia luminii la sîngele recoltat cu anticoagulant supus agitării, la 60 secunde după oprirea mișcării. Formarea de rulouri diminuează reflexia și, deci, reflexia globală a luminii depinde de gradul de agregare a hematiilor. Curba (silectogramă) obținută reprezintă expresia cantitativă, a agregării globulelor roșii, în timp ce timpul de înjumătățire a reflexiei măsoară formarea rulourilor. La o concentrație standard de Hb de 15 g pe 100 ml timpul de înjumătățire este de circa 0,2 secunde. 5) *Rezonanța magnetică nucleară* a fost, de asemenea, utilizată, lărgimea liniei protonului apei fiind aproximativ 3 Hz în soluție salină și 6 Hz în prezența dextranului sau a fibrinogenului. Rezultatele indică o sensibilitate a liniei protonului din apă la agregarea celulelor (88).

Datele referitoare la forma, deformabilitatea și agregarea eritrocitară sînt utile în hemoreologia clinică numai în măsura în care sînt integrate în cadrul factorilor majori ai viscozității sanguine. În figura 40 prezentăm o schemă globală a factorilor care afectează acest parametru de importanță particulară în clinică.

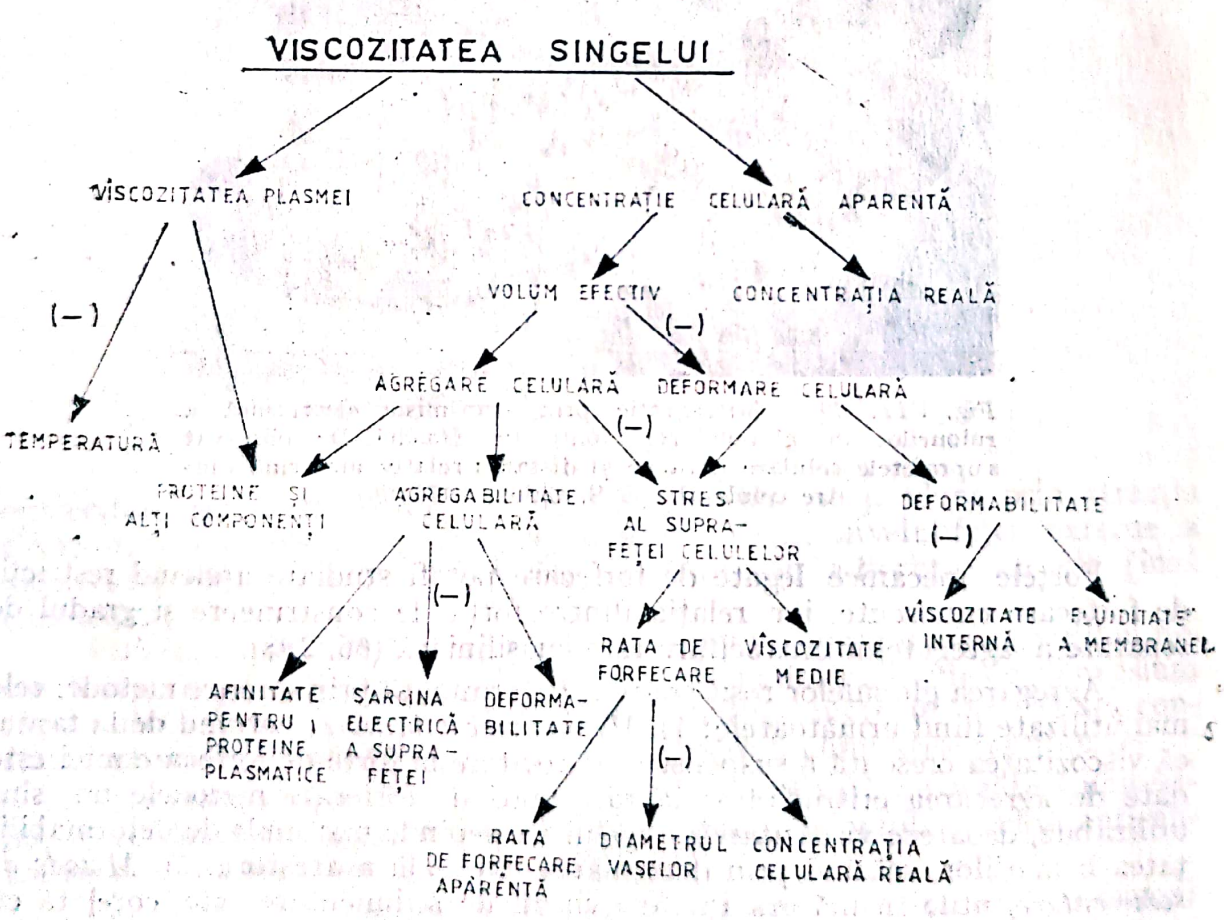


Fig. VII. 40 — Locul caracteristicilor microreologice eritrocitare în ansamblul factorilor determinanți ai viscozității sanguine.

Scanned with OKEN Scanner

5.4. Modificări clinice ale microreologiei eritrocitare

Posibilitatea măsurării deformabilității hematiei a incitat la numeroase investigații clinice, constatîndu-se în numeroase boli o reducere a acestui parametru global al comportării microreologice a celulei. Inițial, investigarea a fost concentrată asupra afecțiunilor hematologice, studiile recente abordează și alte domenii ale patologiei, îndeosebi cel cardiovascular. De asemenea, deformabilitatea eritrocitară constituie frecvent obiectul cercetărilor de farmacologie clinică.

Deși numeroase, studiile clinice oferă date dispersate și uneori discutabile, consecutiv utilizării unor tehnici puțin specifice, sau chiar nespecifice pentru parametrii măsurați, de aceea rezultatele trebuie acceptate critic. J. F. Stoltz consideră necesar, deopotrivă recursul la tehnici mai precise, ca și adoptarea sistematică a unui punct de vedere hemodinamic, conform căruia o modificare a deformabilității sau a agregabilității hematiilor poate conduce, printr-un mecanism de conexiune inversă, la accentuarea perturbărilor și, în consecință, la favorizarea ischemiei (315).

Afecțiunile hematologice pot fi diferențiate funcție de alterările proprietăților microreologice ale globulului roșu în trei grupe: a) boli cu alterarea viscozității interne; b) boli în care se modifică forma și proprietățile reologice ale membranei; c) sindroame de hiperviscozitate.

a) Din *prima grupă*, drepanocitoza (siclemia sau anemia hemolitică cu hematii falciforme) reprezintă exemplul cel mai pregnant. Precipitarea Hb transformă sîngele într-o suspensie de particule rigide, rezultînd o considerabilă creștere a vîscozității sanguine aparente. Alterările reologice pot fi incluse în cadrul fiziopatologic al bolii, iar simptomele clinice devin explicabile luînd în considerare aceste modificări.

Există și alte boli în care aptitudinea de deformare a hematiei este afectată de alterarea stării de „fluiditate" a hemoglobinei: beta-talasemia, hemoglobinozele determinate de hemoglobine instabile (hemoglobină CC, hemoglobină Köln și altele). Nu s-au putut încă stabili precis relații între gravitatea clinică, parametrii reologici și modificările biochimice (186, 315).

b) Pentru *grupa a doua*, exemplul reprezentativ este sferocitoza, al cărei diagnostic se bazează pe criterii reologice, ca și în eliptocitoza ereditară. În aceste cazuri defectul membranei este constituțional. Modificări reologice au fost detectate în anemii hemolitice de etiologie diversă.

Au fost descrise, de asemenea, modificări reologice provocate de alterări secundare ale biomembranelor. Astfel, acantocitoza și sindromul Zieve, întîlnit la alcoolici, reprezintă două exemple de hiperhemoliză provocată prin perturbarea fosfolipidelor și a reînnoirii colesterolului din membrană. Este importantă confirmarea, prin aceste tulburări patologice, a unor rezultate din cercetarea fundamentală care aveau pînă nu demult o tentă abstractă, teoretică (315).

c) *În sindroamele de hiperviscozitate* prin hiperproteinemii sau disproteinemii perturbarea eritrocitară majoră constă în accentuarea formării de rulouri. Agregarea hematiilor se produce mai ușor, iar disocierea agregatelor este redusă. S-au stabilit relații clare între proprietățile mecanice ale rulourilor și tulburările secundare observate.

În *bolile cardiovasculare* într-o serie de lucrări mai vechi s-a menționat creșterea viscozității sîngelui, în faza acută a infarctului, în insuficiența coro-

Scanned with OKEN Scanner

nariană, arteriopatii și în insuficiența vasculară cerebrală (88). Modificările erau explicate prin corelațiile cu creșterea fibrinogenului, a hematocritului sau a pragului de disociere a rulourilor de hematii. Investigațiile recente incriminează, însă, alterări ale parametrilor microreologici, care conduc la variații ale deformabilității, deci, un sindrom de hiperviscozitate plurifactorial. Astfel, în infarctul de miocard se constată o reducere a deformabilității, care se accentuează în cazul complicațiilor (197).

Poate deveni foarte utilă în practica clinică semnalarea recentă a unor particularități reologice la bolnavii cu preinfarct. Astfel, alterările hemoreologice sînt mai marcate la pacienții care au evoluat ulterior spre necroză miocardică, decît la cei cu evoluție favorabilă, spre stabilizare. În plus, analiza parametrilor hemoreologici la bolnavi sugerează că perturbările observate nu sînt doar secundare ischemiei miocardice, ci au un rol sigur în declanșarea și agravarea acesteia. Modificarea principală nu trebuie considerată cea a deformabilității, ci creșterea formării de agregate de hematii puțin disociabile. Această alterare persistă mai multe săptămîni și pare în relație cu gravitatea bolii (315).

În *arteriopatia cronică obliterantă* a membrelor inferioare s-a observat o diminuare a deformabilității eritrocitare, în toate cazurile, mai accentuată în prezența complicațiilor (216, 259). Date comparabile au fost obținute și în celelalte arteriopatii cronice (33). Concomitent cu diminuarea deformabilității crește formarea de rulouri, fenomene proporționale cu gravitatea semnelor clinice, cum ar fi durerea de decubitus. Aceste constatări impun decelarea eventualelor anomalii moleculare responsabile de diminuarea deformabilității hematiei în cadrul unor afecțiuni care nu sînt de origine eritrocitară. Au fost avansate mai multe ipoteze, printre care, alterarea nivelului de fosforilare a proteinelor din scheletul membranei, în particular al lanțului β al spectrinei. Totuși, s-a afirmat că în arteriopatiile cronice ale membrelor inferioare această ipoteză nu poate fi reținută (216). S-a invocat, de asemenea, modificarea transportului ionilor de Ca. Dacă hematiile sînt supuse la un stres mecanic *in vitro*, într-un viscozimetru rotativ, transferul calciului la nivelul membranei se va modifica. Ori, ionul de Ca^+ modulează în globulul roșu activitatea a numeroase enzime, printre care o serie de proteaze și transglutaminaze. Substraturile principale ale acestor enzime sînt, cu siguranță, proteinele scheletului membranei. Se știe că proteinele sînt extrem de vulnerabile îndeosebi la proteaze. De aceea, se presupune că prin intervenția unei transglutaminaze s-ar modifica distribuția între polipeptidele 4.1 a și 4.1 b, în care se descompune proteina 4.1. Enzima ar provoca o conversie ireversibilă a constituentului 4.1 b în 4.1 a (216). Ipotetic orice modificare a fluxului și concentrației ionului de Ca^+ poate avea, prin enzimele interferate, un răsunet asupra stării scheletului membranei și, în final, asupra deformabilității eritrocitare.

Ipoteza poate fi transpusă *in vivo*, cel puțin în cazul arteriopatiilor. În această stare patologică globulul roșu suportă un stres mecanic crescut în contact cu arterele al căror perete este mai dur decît în mod normal și considerabil retractat. Ținînd seama de experimentele *in vitro* amintite, este posibilă alterarea, în aceste condiții de suprasolicitare a flexibilității hematiei, a circuitului normal de Ca^{2+}. Consecutiv, se poate produce modificarea scheletului membranei. Rămîne însă de explicat cum un eveniment mecanic poate antrena

Scanned with OKEN Scanner

un eveniment biochimic, perturbarea fluxurilor ionice de Ca^{2+}, susceptibilă la rîndul său să modifice statutul reologic al hematiei.

În *insuficiența vasculară cerebrală* au fost invocate modificări ale deformabilității, iar de dată recentă o creștere a agregării eritrocitare, care persistă 2—4 săptămîni (Metodi și colab. citat de 315).

Investigarea parametrilor reologici eritrocitari deschide o perspectivă nouă și în evaluarea unor boli sau stări consacrate ca factori de risc cardiovascular: diabet, hiperlipoproteinemie, hipertensiune arterială, stres, tabagism.

În cazul diabetului este clar demonstrată creșterea importantă a agregării hematiilor, considerîndu-se chiar că există o relație între gradul de agregare și gravitatea microangiopatiei (281). În plus, creșterea agregabilității ar explica tixotropia diminuată a sîngelui. Unii autori corelează filtrabilitatea hematiilor cu controlul glucozei din sînge, susținînd că ea este apropiată de normal cînd există un echilibru glicemic satisfăcător. Dimpotrivă filtrabilitatea scade mult (și implicit, deformabilitatea) în precomă și comă (v. fig. 41). Pe de altă

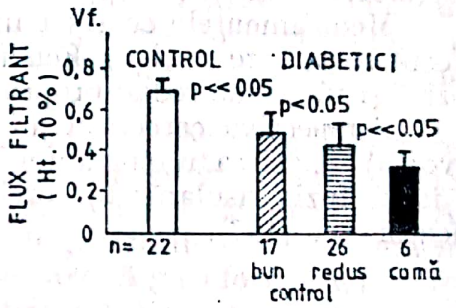


Fig. VII. 41 — Filtrabilitatea globulelor roșii prin pori cu diametrul de 5 micrometri la subiecți normali și la diabetici. Control bun: nivelul postprandial al glucozei 189 mg/dl; control redus; nivelul postprandial al glucozei 230 mg/dl (După H. Schmid-Schönbein și E. Volger, 1976) (280).

parte, reglarea riguroasă a glicemiei cu ajutorul pancreasului artificial antrenează o tendință la normalizare a parametrilor reologici perturbați (315). În ciuda originii multifactoriale a modificărilor hemoreologice observate în cursul diabetului, determinarea acestora prezintă cu certitudine un interes în prognosticul bolii.

Modificări microreologice, constînd în diminuarea deformabilității și creșterea agregării globulelor roșii, au fost observate, de asemenea, în hiperlipoproteinemii și în hipertensiunea arterială esențială. Cauzele acestor alterări rămîn însă de domeniul ipotezelor.

Există alte numeroase boli în care s-au descris modificări ale filtrabilității eritrocitare. Enumerăm, fără intenția unei cuprinderi complete: a) alterări în cadrul intervențiilor chirurgicale majore; b) variații care acompaniază ciclul ovulator, cînd deformabilitatea este mai redusă în faza luteală față de faza foliculară a ciclului; c) alterări ale proprietăților reologice eritrocitare în malarie; d) reducerea filtrabilității globulelor roșii fetale, se presupune atribuită modificării compoziției în lipide la nivelul membranelor hematiilor deformate (79); e) modificarea fluidității membranei în boala Huntington; f) descreșterea deformabilității hematiilor la fumători, probabil prin creșterea carboxihemoglobinei, modificări enzimatice intraeritrocitare, inclusiv reducerea ATP (187); g) în sclerodermie (scleroză progresivă sistemică) pe lîngă mobilitatea electroforetică redusă, hematiile prezintă o aderență scăzută la celulele endoteliale în cultură, ca și o rigiditate crescută, deci, o scădere a deformabilității (184).

Scanned with OKEN Scanner

Deformabilitatea eritrocitară și medicamentele reprezintă, în condițiile atît de frecventelor modificări ale acestui parametru reologic esențial, o relație de importanță deosebită. Se disting două grupe de medicamente: a) cu efect de creștere a deformabilității; b) cu efect de reducere a flexibilității eritrocitare.

Din prima grupă pot fi luate în considerare: a) *prostaglandinele;* astfel PGE, crește deformabilitatea, iar PGE_2 are efect opus; de exemplu, prin utilizarea unui medicament antiplachetar (Ticlopidine), care crește sinteza de prostaglandine antiagregante, s-a observat la șobolani o scădere a viscozității sîngelui și o creștere a filtrabilității; b) *pentoxifilina*, vasodilatator, crește deformabilitatea, concomitent cu sporirea ATP (197); c) *cinnarizina* și derivatul său bifluorat, *flunarizina* (vasodilatatoare prin reducerea influxului de Ca^{2+} la nivelul celulelor musculare) au un efect benefic asupra deformabilității, prin acțiune la nivelul relației Ca^{2+}-ATP (89); d) *alte numeroase substanțe* sînt de asemenea atestate ca avînd același efect: unele β-blocante (alprenolol), substituenți de plasmă (dextran 40), procaina hidroclorică, rutozidele, cianații, salicilații etc.

Medicamentele cu efect în reducerea deformabilității, pot fi sursa unor efecte secundare nocive. Fenotiazina alterează forma hematiei; unele anestezice și vitamine reduc proprietățile microreologice ale hematiei.

Perspectiva cercetării microreologiei globului roșu vizează două obiective: a) definirea importanței deformabilității eritrocitare în hemodinamică și în perfuzia tisulară; b) corelarea parametrilor microreologici cu structura membranei (197).

6. INTERACȚIUNILE HEMOGLOBINĂ-MEMBRANĂ ERITROCITARĂ

Citosolul eritrocitar este sediul metabolismului de care depind durata de viață eritrocitară și integritatea funcției oxiforice a hemoglobinei. Reglarea metabolismului hematiei se produce prin interferența membranei, ceea ce conduce la interacțiuni necesare între enzimele citosolice și membrană. S-a demonstrat că o serie de enzime sînt supuse unei translocări între citosol și membrană, aceste mișcări moleculare avînd un rol în reglarea metabolică (39, 40).

Existența interacțiunilor hemoglobină-membrană a devenit certă în momentul încercărilor de obținere a unor fantome eritrocitare cu un conținut de hemoglobină cît mai redus, așa-numitele strome albe. La pH-ul 6,15 rămîne încă 1% din hemoglobină legată de membrane; la aceeași hipotonie, dar la pH 7,65 hemoglobina este eliberată total (91).

Prin introducerea în membrane a unei sonde fluorescente [acidul 12(9-antroil)-stearic] se observă că fixarea Hb la membrană antrenează o extincție a fluorescenței emisă de sondă. Se confirmă existența unei interacțiuni electrostatice, noncooperativă și reversibilă între membrană și Hb. Prin aceeași metodă s-au descris două tipuri de locuri de legătură: unul cu afinitate înaltă, cu o constantă de asociere de ordinul $1 \times 10^8 M^{-1}$ pentru un număr de locuri de legare evaluat la $1,2 \times 10^6$ pe celulă, iar altul de afinitate slabă, cu o constantă

Scanned with OKEN Scanner

de ordinul $10^7 M^{-1}$ și 6×10^6 locuri de legare pe celulă (285). Datele fiind obținute însă, *in vitro*, în condiții sensibil diferite de cele fiziologice au fost interpretate cu rezervă.

Recent (1981) s-a măsurat mobilitatea unui marcher introdus în proteinele feței citoplasmatice a membranei, sub influența prezenței Hb în concentrații variabile și la diferite valori ale pH-ului (111). S-a putut pune astfel în evidență interacțiunea Hb-membrană. Această interacțiune este larg dependentă de concentrația Hb între 0 și 12 mg/ml. Semisaturarea locurilor de legătură este de 4 mg/ml, între pH 7,4—7,8. Echilibrul de disociere se situează în jurul a 10^{-4}M, dar diminuă semnificativ cu scăderea pH-ului. Semisaturarea ar fi de ordinul 10^8 molecule Hb pe celulă, în timp ce se admite că globulul roșu conține circa $2{,}5 \times 10^8$ molecule de Hb. Interacțiunea este de slabă afinitate.

Prin izolarea și caracterizarea moleculelor componente ale membranei eritrocitare au putut fi identificate precis locurile de interacțiune. Astfel, la nivelul proteinei din banda 3 a membranei sînt situate locurile de afinitate înaltă. Segmentul intern, purtător de NH_2 terminal, este sediul unor legături nu numai cu scheletul membranei, dar și cu enzimele citosolice: gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH), aldolaza și fosfofructochinaza (40, 39). Demonstrarea definitivă a fost efectuată prin studiul direct al interacțiunii între Hb și segmentul intern al benzii 3, izolat și purificat.

Glicoforina A, a doua proteină transmembranară importantă, este de asemenea susceptibilă să fixeze Hb pe segmentul său intern citoplasmatic, purtător de COOH terminal. Vezicule lipidice reconstituite cu glicoforina A, fixează Hb proporțional cu numărul de molecule de glicoforină al căror segment intern este expus spre exteriorul veziculelor. Se pare că glicoforina A, al cărei număr de cópii pe celulă este identic cu al proteinei 3, împarte cu segmentul intern al acesteia din urmă posibilitatea de a se fixa pe Hb. Afinitatea legăturii Hb la glicoforină nu a fost stabilită, dar se pare că este slabă (39).

Lipidele, de asemenea, ar fixa pe locuri de slabă afinitate 38% din totalitatea Hb legate. Interacțiunea, studiată pe straturi monomoleculare, se produce în regiunile acide ale filmului lipidic, diminuează cu creșterea pH-ului și se efectuează cu fosfatidilserina (320).

După cum se observă, există probe suficiente, deși incomplete, asupra interacțiunii hemoglobinei cu membrana. Consecințele acestei interacțiuni se exprimă asupra: 1) funcțiilor hemoglobinei și 2) stării proteinelor din membrană.

1) În esență, *funcțiile hemoglobinei* sînt influențate astfel: fixarea enzimelor citosolice ale membranei, îndeosebi a GAPDH la segmentul intern al benzii 3, produce modificarea caracteristicilor funcționale ale enzimelor (39).

Afinitatea deoxiHb pentru legarea la banda 3 este mult mai redusă decît cea a oxiHb (272). S-a sugerat că oxiHb s-ar fixa sub formă dimerică, iar deoxiHb sub formă de tetramer (272). Acest fapt este important, deoarece eliberarea oxigenului de către lanțul β al dimerului legat de membrană este încetinită de 20 ori, fenomen analog modificărilor cinetice ale enzimelor legate (272).

S-a mai demonstrat prin RES că mobilitatea rotatorie a Hb este mult diminuată prin legarea cu situsurile de înaltă afinitate, dar ea nu este influențată prin extracția citoscheletului (63).

Scanned with OKEN Scanner

2) Consecințele interacțiunii asupra *stării proteinelor din membrană* sînt următoarele:

Chiar dacă hemoglobina nu pare să se lege cu proteinele citoscheletului, există interacțiuni electrostatice de slabă afinitate Hb-spectrină. Astfel, extrasă la 4°C, la forță ionică slabă sub formă de tetramer, spectrina este convertită în dimer *in vitro* la 37°C, pînă la un echilibru termodinamic simplu. Dacă în soluție se introduce hemoglobină pură, această probă de dimerizare se modifică; spectrina este stabilizată sub formă tetramerică, forma de dimer fiind foarte redusă. De aceea, s-a sugerat că hemoglobina ar favoriza asocierea spectrinei, contribuind astfel la menținerea echilibrului citoscheletului (195).

Hemoglobina influențează, de asemenea, disocierea complexelor moleculare spectrină-proteină 4.1-actină. Astfel, la extragerea din membrană masa acestora este $1,4 \times 16^6$ daltoni, iar în prezența HbA, în soluție hipotonă și la pH 7,6 aceste complexe sînt parțial disociate, masa lor moleculară medie fiind foarte redusă, $1,1 \times 10^6$ daltoni. Acțiunea nu este specifică Hb, dar prin concentrația sa importantă în eritrocit ea ar putea influența arhitectura membranei (346).

Spectrina și hemoglobina se află în competiție în fixarea 2,3-difosfogliceratului, iar acesta din urmă, ca și alți polifosfați, disociază citoscheletul (39).

Într-o serie de *procese patologice* a fost relevată alterarea unora dintre interacțiunile amintite. Astfel, se știe că prepararea membranelor albe, lipsite de Hb este mai dificilă în cazul drepanocitelor. Explicația constă în fixarea ireversibilă a HbS, care ar fi determinată de o interacțiune hidrofobă cu lipidele membranei, mai puternică decît în cazul HbA.

Unii autori au sugerat că prezența membranei ar crește polimerizarea HbS, servind drept loc pentru debutul reacției de polimerizare (289).

Se cunosc în mică măsură consecințele fixării hemoglobinelor anormale la nivelul structurii membranare. Se știe că fixarea HbS antrenează leziuni ireversibile ale scheletului membranei. Rămîne de determinat dacă această acțiune este directă, sau indirectă prin intermediul deshidratării celulare sau a acumulării calciului (68).

Chiar dacă datele sînt incomplete se poate afirma că în circumstanțe patologice crește importanța interacțiunilor hemoglobină-membrană.

7. MEMBRANA ERITROCITARĂ ÎN PATOLOGIE

În paginile anterioare ne-am referit frecvent la implicarea membranei globulului roșu în patologie. Încercăm să prezentăm, în finalul acestui capitol, o serie de date de ansamblu asupra modificărilor patologice de la nivelul membranei eritrocitare, insistînd îndeosebi asupra rezultatelor care pot fi integrate într-un context patogenetic precis. Datorită numărului excepțional de mare al lucrărilor publicate, o sinteză completă devine imposibilă.

Sînt necesare cîteva observații prealabile: a) prin rezultatele obținute în studiul patologiei de membrană, hematia se dovedește același model extrem de util, multe din constatările experimentale fiind productive în cercetarea altor membrane celulare; b) se confirmă că globulul roșu nu este o celulă „în agonie"

Scanned with OKEN Scanner

ci doar una dintre celulele cel mai înalt specializate din organism, angajată funcțional și structural în relații dintre cele mai subtile; c) dacă o lungă perioadă de timp cercetarea proceselor patologice cu punct de pornire la nivelul membranei, sau cu interferarea membranei s-a bazat pe probe indirecte, care nu permiteau corelația cu organizarea moleculară, în prezent relația structură moleculară — funcții alterate devine tot mai clară; d) rezultă din constatarea anterioară un progres cert către definirea „leziunilor" moleculare ale membranei eritrocitare și prin aceasta a patologiei de membrană; e) există încă multe date contradictorii, iar uneori reflectarea în practica medicală a rezultatelor obținute este redusă.

7.1. Criterii de clasificare în modificările patologice ale membranei eritrocitare

Acumularea explozivă a datelor a condus la încercări de clasificare a multiplelor modificări patologice de la nivelul membranei eritrocitare.

O alternativă frecventă de clasificare este următoarea: a) boli exprimate predominant la nivelul membranei eritrocitare; b) alterări ale membranelor eritrocitare secundare unor boli;) c) modificări ale membranei în cadrul unor defecte de membrană cu caracter generalizat. Uneori însă modificările patologice ale membranei eritrocitare sînt greu de integrat într-o clasă sau alta de boli. În definirea conceptului de leziune a membranei trebuie să se considere interacțiunile moleculare de la acest nivel, în toată complexitatea lor. Spre deosebire de mai bine cunoscutele „leziuni biochimice" care pot să fie identificate relativ ușor prin intermediul unei enzime specifice sau a unei proteine, leziunea membranei nu angajează doar o moleculă sau un tip de molecule, manifestarea patologică putînd rezulta dintr-o serie de evenimente colective apărute împreună cu defectul inițial.

Întrucît conceptul de leziune a membranei impune existența unor alterări moleculare, rezultă un alt criteriu de clasificare, funcție de modificarea tipurilor de molecule componente ale membranei eritrocitare: a) proteine intrinseci și periferice membranei (inclusiv citoscheletul); b) lipide membranare; c) glicoproteine; d) enzime asociate membranei: e) precum și hemoglobinopatii afectînd structura și funcțiile membranei eritrocitare. O asemenea clasificare are inevitabil defectul izolării alterărilor de contextul patogenetic, nefiind deci relevantă pentru clinicieni și utilă în primul rînd pentru cercetători. De aceea, vom parcurge doar în sinteză primele două grupe de modificări.

a) Analiza *alterării proteinelor membranei* ne oferă un exemplu clar, de „complicare" a explicației patogenetice într-o serie de anemii. După ce, în urmă cu mai mulți ani ținta explicațiilor era reprezentată de enzimele hematiei și variațiile transportului de ioni, ulterior interesul s-a deplasat către studiul măsurării proprietăților reologice globale ale eritrocitului, pentru ca în prezent să se ia în considerare îndeosebi rolul scheletului membranei eritrocitare.

Ca urmare „o nouă patologie moleculară a globulului roșu de om este în curs de delimitare: cea a proteinelor scheletului membranar, făcînd să se dezintegreze cadrul clasic al anemiilor hemolitice" (P. Boivin, 38).

Numai că această „dezintegrare" nu se produce prin renunțarea la achizițiile anterioare. Pe de altă parte, chiar datele aparent atestate sînt reexaminate cu metode și tehnici noi, de aici rezultînd alte „dezintegrări".

Scanned with OKEN Scanner

Totuși, cu o singură excepție și anume anemia megaloblastică severă, în aceste boli nu au fost detectate alterări caracteristice ale scheletului membranei. Precizăm că în anemia megaloblastică, secundară deficienței de acid folic sau vitamină B_{12}, au fost descrise deficiențe specifice ale spectrinei și proteinei benzii 3 (17).

Din acest grup, cel mai bine conturate sînt anomaliile spectrinei (tabel XIII).

TABELUL XIII

Alterări ale spectrinei și consecințe patologice

Alterarea	Boala	Referința
I — Deficit de spectrină	— Anemie megaloblastică severă	(17)
	— 4 mutanți la șoarecele de casă (*Mus musculus*):	(201)
	1 — Sferocitoză (absența benzii 1)	
	2 — Anemie hemolitică (reducerea spectrinei)	
	3 — Normoblastic (reducerea spectrinei)	
	4 — Icteric (absența spectrinei)	
II — Fosforilare anormală a benzii 2	Distrofii musculare	(262)
III — Stabilitate anormală a spectrinei		
A) Diminuarea stabilității	Sferocitoză ereditară	(129)
B) Instabilitate termică a spectrinei	1 — Eliptocitoză ereditară	(3)
	2 — Piropoikilocitoză congenitală	
IV — Alterarea organizării spectrinei	Siclemie	(201)
V — Conformație anormală a microfilamentelor de spectrină	Anemie megaloblastică	(17)

Probele asupra alterărilor structurale sau funcționale ale spectrinei, ca și ale altor proteine de la nivelul membranei eritrocitare, se acumulează rapid. Deoarece proteinele membranei eritrocitare nu sînt reînnoite în timpul celor 120 zile de viață ale hematiei, se poate afirma că orice variație cantitativă a acestora este în primul rînd de origine genetică. De altfel, recent, o serie de autori, în primul rînd J. C. Parker și L. R. Berkowitz, trec în revistă o mare parte din modificările patologice ale membranei eritrocitare sub titlul „Variante genetice care afectează structura și funcția membranei globulului roșu uman" (38, 49, 239, 240). Aceste variante, de o mare diversitate, reprezintă adevărate „experimente ale naturii", utile în studiul relației structură-funcție în cazul membranei eritrocitare și, prin extrapolare în studiul tuturor biomembranelor. Alterarea interacțiunilor poate avea însă cauze diverse.

b) Identificarea *alterării lipidelor* este mai ușor de obținut pe plan cantitativ. Deoarece lipidele, așa cum s-a menționat anterior sînt reînnoite,

Scanned with OKEN Scanner

în cazul alterărilor de ordin cantitativ trebuie detectată o eventuală dereglare a *turnover*-ului lipidic al membranei.

Cu toate că lipidele servesc îndeosebi drept component structural al membranei, alterarea lor poate să conducă la modificări drastice ale structurii și funcțiilor membranei. Permeabilitatea, transportul, activitățile enzimatice și rețeaua citoscheletului pot fi afectate prin modificări ale compoziției lipidice. Este cel mai pregnant exemplu în sprijinul afirmației reprezentării membranei ca un sistem integrat, în interacțiune.

În tabelul XIV sînt reprezentate principalele variații ale compoziției în lipide de la nivelul membranei eritrocitare într-o serie de boli și consecințele lor hematologice.

TABEL XIV

Compoziția lipidelor din membrana eritrocitară în cadrul unor boli

(După S. K. Ballas și S. H. Krasnow, 1980, modificat) (18)

Boala sau sindromul	Natura alterării lipidelor eritrocitare	Anomalii hematologice
I — Boli hepatocelulare severe	Creștere marcată a colesterolului și medie a fosfolipidelor. Rapor-turile C/PL și C/L mult crescute.	Anemie cu celule cu „pinteni".
II — Deficiențe ale LCAT		
A — Ereditară	Colesterol crescut și fosfolipide normale. C/PL crescut și C/L nor-mal.	Hematii abundente cu aspect de țintă. Hemo-liză medie.
B — Dobîndită, prin icter mecanic	Colesterol și fosfolipide crescute, în proporții variate, C/PL crescut dar C/L este scăzut. Prezența LP-X.	Hematii abundente cu aspect de țintă.
III — A beta-lipoprotei-nemie	Colesterol normal	Acantocitoză.
A — Ereditară	Lecitină scăzută și sfingomielină crescută. C/PL crescut și C/L este mult crescut.	
B — Dobîndită:	C/PL crescut.	Acantocitoză.
— anorexie nervoasă;		
— ciroze, stadiul terminal.		

Abrevieri; C/PL = raportul colesterol/fosfolipide; C/L = raportul colesterol/lecitină; LCAT = lecitin: colesterol, aciltransferaza. LP-X = lipoproteina X.

Din tabel se observă că la pacienții cu boli hepatocelulare severe crește mult colesterolul la nivelul membranei cu o ușoară creștere a fosfolipidelor. Creșterea raportului colesterol-fosfolipide și reducerea acizilor grași nesaturați sînt factori bine cunoscuți de reducere a mișcărilor moleculare în membrană, avînd ca rezultat o mărire a rigidității acesteia (126). Apar celule cu pinteni, datorită conținutului sporit în colesterol al membranei, de la 25 la 65%. Dacă aceste celule sînt abundente, pot semnifica un prognostic rezervat. Producerea celulelor cu pinteni poate fi indusă prin transfuzia de globule roșii normale la

Scanned with OKEN Scanner

pacienți, prin incubarea *in vitro* a eritrocitelor normale în ser provenind de la bolnavi, sau prin introducerea hematiilor în dispersii bogate în colesterol (77, 295).

Deficiențele ereditare ale lecitin:colesterol aciltransferazei (LCAT) conduc la perturbarea prbcesului de esterificare a colesterolului. LCAT catalizează transferul acidului gras din poziția-2 a lecitinei la colesterol, rezultînd formarea de ester de colesterol și lizolecitină (126). Creșterea colesterolului în membrană se va produce prin modificarea raportului colesterol liber/colesterol esterificat din plasmă. Deoarece *turnover*-ul colesterolului rămîne normal, chiar dacă acesta crește la nivelul membranei, deformabilitatea eritrocitară este normală sau chiar crescută. Hematiile au aspectul de „țintă" (de ochit), suprafața lor conținînd proeminențe deformabile. În cazul icterului mecanic, deși LCAT este normală, inițial enzima va fi inhibată prin conținutul mare de săruri biliare din plasmă. În acest caz s-a pus în evidență o lipoproteină anormală discoidală, alcătuită aproape exclusiv din colesterol și fosfolipide, proteinele reprezentînd doar 6%. LP-X fuzionează cu membrana eritrocitului determinînd alterarea conținutului lipidic (126, 127).

În a-beta-lipoproteinemii se produce, dimpotrivă, datorită deficitului acestor molecule, o reducere marcată a reînnoirii colesterolului din membrana hematiei. Ca urmare, membrana devine rigidă din cauza stagnării colesterolului la acest nivel. Celulele sînt puțin deformabile și prezintă „spini" vizibili, alcătuiți din colesterol. Beta-lipoproteinele pot scădea dramatic și în stadiile terminale ale cirozelor hepatice, prin deficit de sinteză. Apar, în mod analog, acantocite.

În sfîrșit, cauzele a-beta-lipoproteinemiei în cadrul anorexiei mintale rămîn obscure (9).

Se poate afirma că dintre toate anomaliile patologice ale membranei, cele povocate de încărcarea cu colesterol a dublului strat lipidic sînt cel mai bine explicate. Totuși recent s-a demonstrat pe eritrocite de om, *in vitro*, că se poate produce o încărcare în colesterol a membranei fără alterări ale formei și volumului celular, ca și fără variații ale 2,3-DPG și adenilați, fosfolipidele rămînînd de asemenea normale (318). Acestă discrepanță, *in vitro*, rămîne să fie explicată.

Modificările patologice structurale și funcționale ale proteinelor extrinseci și intrinseci ale membranei rămîn încă în mare măsură necunoscute. Descifrarea structurii scheletului membranei creează una din premisele rezolvării acestei probleme.

7.2. Date actuale asupra definirii moleculare a anemiilor

Ne vom referi pe scurt la o nouă clasificare a anemiilor hemolitice și la alterările puse în evidență în anemiile hemolitice congenitale, îndeosebi la nivelul scheletului membranei.

7.2.1 *Reclasificarea anemiilor hemolitice funcție de alterările membranei eritrocitare*

Multitudinea formelor clinice ale anemiilor a generat numeroase clasificări, bazate în principiu pe semnele clinice și o serie de date de laborator considerate caracteristice.

Scanned with OKEN Scanner

Prin utilizarea datelor noi o serie de autori încearcă să „dezintegreze" vechile sistematizări, invocînd necesitatea utilizării drept criteriu unic alterările de la nivelul biomembranelor. Deocamdată cel mai supus restructurării este domeniul vast al anemiilor hemolitice.

O încercare de reclasificare a anemiilor hemolitice, în consens cu datele noi, aparţine lui S. K. Ballas (16).

După cum se ştie, coexistă mai multe clasificări ale anemiilor, dar cel mai frecvent aceste entităţi clinice se clasifică după criteriile ereditare-dobîndite sau cu defecte corpusculare-extracorpusculare. Justificarea noii clasificări decurge, în opinia autorului citat, din necesitatea încorporării datelor la zi de biochimie, biofizică, fiziologie şi de ultrastructură a membranei hematiei. Deoarece fenomènul final comun al tuturor anemiilor hemolitice este disrupţia prematură a membranei eritrocitare cu eliberarea hemoglobinei, se consideră mai adecvată considerarea acestor anemii drept alterări ale membranei eritrocitare.

În opinia sa, anemiile hemolitice în ansamblul se pot clasifica în două mari grupe: a) *alterări primare* ale membranei globulului roşu sau *membranopatii intrinseci;* b) *alterări secundare* ale membranei hematiei sau *membranopatii extrinseci.*

TABEL XV

Alterări primare ale membranei eritrocitare sau membranopatii intrinseci

(După S. K. Ballas, 1978) (16)

A — *Ereditare;*

1 — Sferocitoza ereditară.
2 — Stomatocitoza ereditară.
3 — Sindromul antigen Rh absent.
4 — Eliptocitoza ereditară.
5 — Permeabilitate anormală pentru cationi:
  a — hidrocitoza şi desiccitoza;
  b — anemia hemolitică cu fosfatidilcolină crescută;
  c — încărcarea cu calciu, cu microcitoză extremă.
6 — Distrofii musculare:
  a — distrofia Duchenne;
  b — distrofia musculară miotonică;
  c — anemia congenitală diseritropoietică de tip II (HEMPAS).

B — *Dobîndite;*

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă.

În cea de-a doua grupă se disting două subgrupe: 1) alterări proximale în raport cu membrana (cazul anormalităţilor intracelulare şi citoplasmatice); 2) alterări distale în raport cu membrana (adică, anormalităţi extracelulare). (16).

Fiecare din cele două grupe conţin o serie de tipuri de anemii, uneori aparent foarte diferite. Se observă includerea în cele două mari clase de anemii a unor entităţi încă insuficient conturate, dintre care unele nu au deocamdată o denumire precisă.

O clasificare este prin definiţie restrictivă, în felul acesta explicîndu-se eludarea unor date. De exemplu, nu se face nici o referire la alterările cito-

Scanned with OKEN Scanner

TABEL XVI

Alterări secundare ale membranei eritrocitare sau membranopatii extrinseci
(După S. K. Ballas, 1978) (16)

A — *ALTERĂRI PROXIMALE ÎN RAPORT CU MEMBRANA (ANORMALITĂȚI INTRACELULARE ȘI CITOPLASMATICE)*

I — *Afectări ale enzimelor (enzimopatii)*
- a) perturbarea căii pentoză-fosfat:
  - 1 — ereditară
  - 2 — dobîndite: uremie, anemie prin deficiență în fier.
- b) perturbarea căii glicolitice:
  - 1 — ereditară
  - 2 — dobîndită (hipofosfatemie).

II — *Alterări ale globinei:*
- a) defecte în structura globinei (hemoglobinopatii)
- b) defecte în sinteza globinei (talasemii).

III — *Alterări ale hemului (porfirii):*
- a) protoporfiria eritropoietică
- b) porfiria congenitală eritropoietică (uroporfiria eritropoietică).

IV — *Defecte de maturație nucleară:*
- a) anemia megaloblastică.

B — *ALTERĂRI DISTALE ÎN RAPORT CU MEMBRANA (ANORMALITĂȚI EXTRACELULARE)*

I — *Anormalități ale lipidelor membranare*
- a) ereditare:
  - 1 — acantocitoza ereditară (a-beta-lipoproteinemia)
  - 2 — deficiența de lecitin: colesterol aciltransferază (LCAT).
- b) dobîndite:
  - 1 — afecțiuni hepatice
  - 2 — infecții cu Clostridium
  - 3 — *anorexia nervosa*
  - 4 — decficiența de vitamină E

II — *Tulburări imunohemolitice:*
- 1 — alloimune
- 2 — autoimune

III — *Sindroame de fragmentare:*
- 1 — anemia hemolitică cardiacă
- 2 — tulburări microangiopatice

IV — *Alterări miscelanee:*
- 1 — o serie de agenți infecțioși
- 2 — agenți fizici
- 3 — medicamente, substanțe chimice și veninuri.

scheletului membranei din cadrul mai multor anemii, precum și existența grupei de anemii intitulată alterări miscelanee.

Ca urmare a cunoașterii avansate a structurii și funcțiilor membranei eritrocitare, studiul anemiilor beneficiază într-o măsură mult mai mare decît alte domenii ale patologiei de posibilitățile extraordinare oferite de tehnicile și metodele biologiei moleculare. Cu speranța că explicațiile nu sînt prea prolifice, oferim doar un exemplu. Astfel, în ultimii ani s-au dezvoltat foarte mult metodele prin care se obțin imagini analitice ale celulelor. Pe scurt, meritul conceperii acestor metode revine lui R. Castaing și G. Soldzian, iar aplicarea lor în biologia celulară a fost realizată în primul rînd de P. Galle.

Scanned with OKEN Scanner

Prezentăm, după P. Galle (115, 116), principiile microsondei electronice și microscopiei ionice analitice, care pot fi reunite sub denumirea generică de microanaliză nucleară. Microscopia electronică nu oferă decît imagini morfologice, care nu furnizează date asupra naturii elementelor chimice constituente, ale probei examinate. Primul pas în rezolvarea acestei probleme s-a produs prin asocierea unui spectrometru de radiații X cu un microscop electronic (fig. 42). Bombardînd cu electroni o zonă precisă a probei de examinat, fiecare

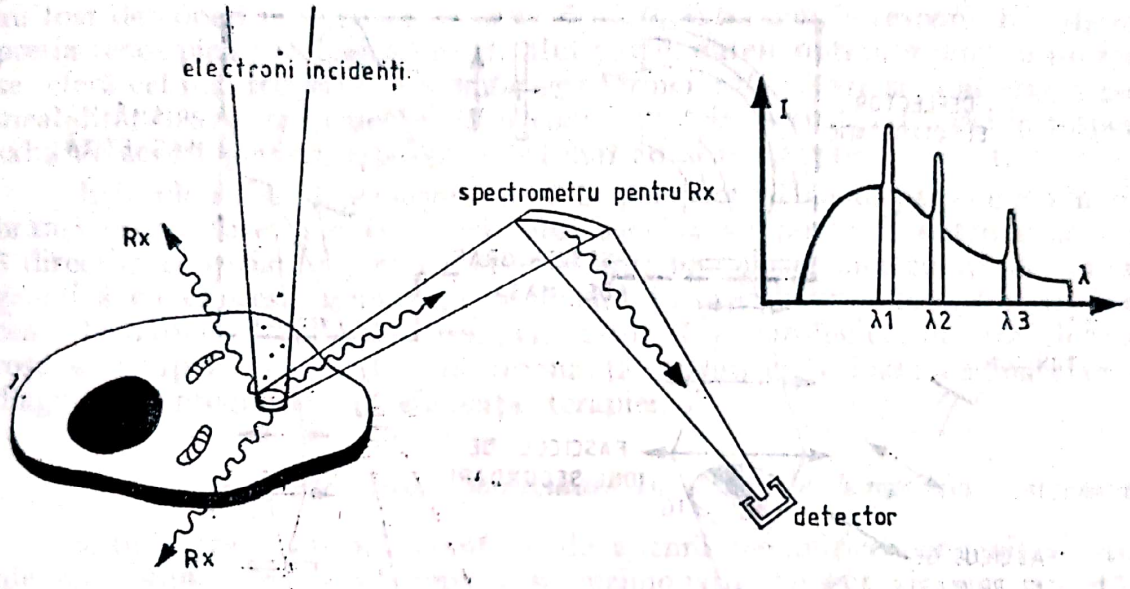


Fig. VII. 42 — Reprezentarea schematică a principiului de funcționare al unei microsonde electronice. Explicații în text (După P. Galle, 1986) (116).

element chimic emite radiații X cu o lungime de undă λ caracteristică. Este suficient, deci, să se selecționeze cu spectrometrul de radiații X lungimile de undă caracteristice emise de către atomii probei, pentru a afla natura chimică a elementelor prezente. Fasciculul de electroni servind la explorarea suprafeței de examinat are un diametru cuprins între 0,1 și 1 μm, iar grosimea probelor studiate este de 0,05 μm. În acest fel microanaliza se poate efectua pe volume intracelulare de dimensiuni submicroscopice. Cu această metodă poate fi studiată repartiția tuturor elementelor cu un număr atomic $Z \leqslant 11$ (sodiu). Probleme deosebite, parțial rezolvate, se pun în cazul detectării ionilor difuzibili, printre care se află cationii de interes major Na^+, K^+, Ca^{2+}.

Un progres în raport cu microsonda electronică descrisă anterior îl reprezintă microscopia ionică analitică. fig. 43). Prin această tehnică se obține harta de distribuție a unui element chimic repartizat la suprafața unui eșantion solid. „Imaginile analitice" astfel obținute au o rezoluție de ordinul 0,5 μm, adică apropiată de a microscopului optic. Dar interesul principal al metodei este sensibilitatea sa excepțională. Astfel, un element ca aluminiul poate fi detectat într-o secțiune histologică, (ceea ce conduce la obținerea unei imagini a distribuției microscopice) la concentrații extrem de reduse. inferioare a 0,1 ppm într-un volum de un micron cub, ceea ce înseamnă o sensibilitate de 1 000 de ori mai mare decît în cazul microsondelor electronice.

Scanned with OKEN Scanner

În principiu (fig. 43) la microscopul ionic analitic, suprafața obiectului (secțiunea histologică) este bombardată de un fascicul de ioni primari. Diametrul zonei de impact este de ordinul 250 μm. Sub influența bombardamentului, straturile atomice cele mai superficiale sînt smulse progresiv, iar proba de examinat este erodată în ritmul de aproximativ un strat atomic pe secundă. Unii dintre acești atomi sînt emiși sub formă de particule încărcate: ionii secundari care sînt accelerați printr-o diferență de potențial și focalizați într-un fascicul care transportă imaginea globală (IG) a tuturor ionilor smulși la un

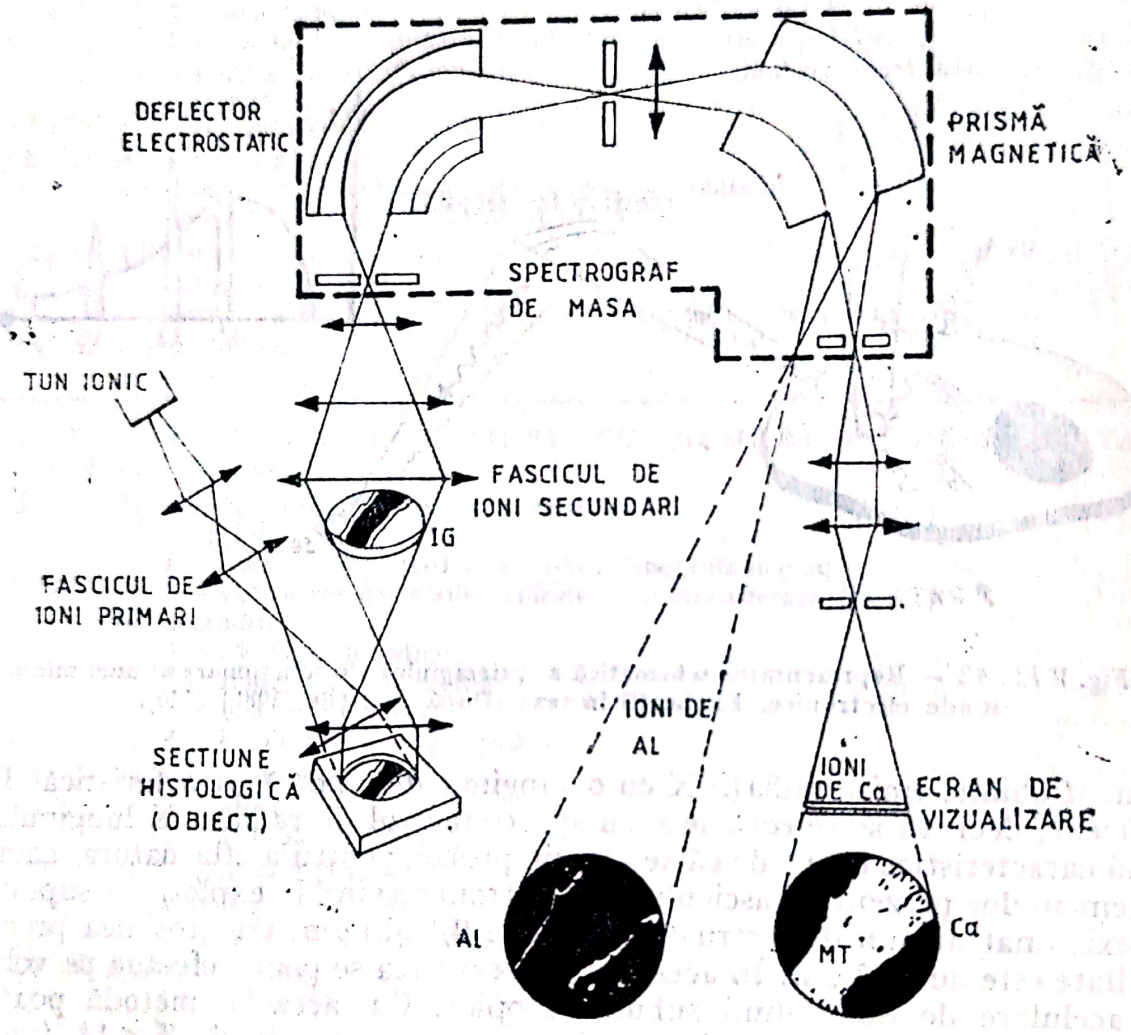


Fig. VII. 43 — Principiul obținerii de imagini prin microscopia ionică analitică. Explicații în text (După P. Galle, 1986) (116).

moment dat. Un spectrometru de masă alcătuit dintr-un deflector electrostatic și dintr-o prismă magnetică, va curba în continuare traiectoria acestor ioni, iar devierea va fi cu atît mai mare cu cît ionii secundari au o sarcină electrică specifică mai importantă. Calitatea imaginilor nu se alterează în cursul acestor devieri. La ieșirea din spectrometrul de masă, fasciculul transportînd imaginea globală este astfel separat într-un număr de fascicule egal cu numărul ionilor de o sarcină specifică dată. Ca urmare, în continuare se poate selecționa fasciculul corespunzător ionului studiat și apoi el este dirijat către un sistem de vizualizare, ce comportă un ecran fluorescent, la nivelul căruia se observă imaginea analitică a distribuției ionului.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul anemiilor, P. Galle, cu care am colaborat în această investigare, a pus în evidență imagini care atestă că aluminiul este la originea unor anemii prin substituirea fierului, probabil, în etapele de sinteză a hemoglobinei

Un criteriu care ar putea genera, prin aplicarea sa, mai multă ordine și coerență în clasificarea anemiilor, dar și a altor boli cu implicare a membranei eritrocitare este cel genetic. Se știe că o mare parte din dezordinele structurale și funcționale ale membranei eritrocitare sînt expresia unor variante genetice, probabil, a unor gene ce conțin mutații. Deocamdată în foarte puține cazuri au fost descoperite, sau sînt în curs de detectare, genele responsabile de expresia fenotipică patologică. Pe de altă parte, datele obținute pînă în prezent se referă cel mai frecvent la modificarea formei eritrocitare și la alterarea permeabilității, dar componentul (sau componentele) structural specific responsabil de aceste devieri patologice, cel mai adesea, nu este cunoscut.

Este plauzibil să presupunem că în perspectivă vasta patologie a membranei eritrocitare și a citoscheletului asociat va putea fi sistematizată în 3 direcții: a) variante genetice eritrocitare; b) defecte moleculare de origine genetică cu expresie fenotipică la nivelul tuturor biomembranelor, inclusiv cea a hematiei; c) tulburări secundare altor stări patologice, în care globulul roșu se comportă ca o celulă de rezonanță, uneori cu valoare de marcher în diagnostic, prognostic și eficiența terapiei.

7.2.2. *Modificări moleculare în anemiile hemolitice congenitale*

Există trei categorii esențiale de anemii hemolitice congenitale: boli ale membranei, hemoglobinopatii și enzimopatii. Obiect al unor cercetări, de o anvergură rareori egalată, mai multe entități patologice din acest grup de anemii beneficiază de o explicare moleculară aproape completă.

Din prima grupă modelul patologic cel mai studiat, *sferocitoza ereditară* (sau boala Minkowski-Chauffard) este cea mai comună formă de anemie hemolitică din Nordul Europei, cu o prevalență particular crescută (1/500) la tipul uman caucazian. Boala este diagnosticată prin prezența în sîngele periferic a sferocitelor, care coexistă cu grade variate de hemoliză și anemie. Prin splenectomie se produce o ameliorare, dar nu vindecare. O serie de rezultate au tentat pe mulți cercetători să considere boala drept consecință a alterării membranei eritrocitare: eritrocitele circulante au un volum normal, dar o arie a suprafeței și un conținut în lipide redus (331, 335). Forma sferică și conținutul crescut în hemoglobină conduc la o deformabilitate redusă (227). *In vitro* celulele prezintă o creștere a permeabilității pentru Na^+ și tendința de pierdere a lipidelor de suprafață prin depleție metabolică (76).

O altă serie de constatări experimentale sînt controversate: a) reducerea fosforilării proteinelor de la nivelul membranei (32); b) distribuția anormală a acizilor grași din fosfolipide; c) alterarea microviscozității membranei (39); d) diminuarea transportului activ de Ca^{2+} (355). Cei mai mulți pacienți prezintă o distribuție normală a proteinelor membranei la separarea acestora prin electroforeză în gel de poliacrilamidă-SDS, dar au fost raportate două familii cu reducerea benzii 4.2. S-au mai semnalate o serie de anomalii ale proteinelor relativ la solubilitate, extracție din membrană și activitate ATP-azică, fără să fie posibilă integrarea lor cu modelul ultrastructural al membranei (348). Inventarul modificărilor semnalate este încă și mai cuprin-

Scanned with OKEN Scanner

zător. Mai menționăm doar creșterea *turnover*-ului ATP, creșterea glicolizei, scăderea 2,3-DPG și a pH-ului intracelular (163).

Clarificarea, considerată de cei mai mulți cercetători decisivă, s-a produs odată cu descrierea citoscheletului și cu transpunerea metodelor utilizate în acest scop, pentru studiul sferocitului. Demonstrarea anomaliei moleculare a fost realizată simultan de două echipe (în anul 1982): un deficit al interacțiunii spectrină-banda 4.1, determinat de o anomalie a lanțului β al spectrinei (129, 351). Anomalia a fost găsită la circa 1/3 din familiile, cu sferocitoză ereditară tipică, studiate. Toți bolnavii sînt purtători de două tipuri moleculare de spectrină: unul cu toate caracteristicile spectrinei normale, iar altul, care reprezintă circa 40% din spectrina totală, se deosebește prin faptul că nu se poate lega de proteina 4.1. Incapacitatea de fixare a acestui tip de spectrină a fost demonstrată clar atît pe coloană conținînd proteină 4.1 — sefaroză, cît și prin utilizarea proteinei 4.1 marcată cu ^{125}I. Se pare că anomalia este situată pe lanțul β al spectrinei, la extremitatea opusă locurilor de fixare pentru ankirină și de fosforilare. Deocamdată nu se pot stabili detaliile submoleculare ale acestei alterări, datorită necunoașterii „hărții" lanțurilor peptidice lungi ale spectrinei. S-a propus denumirea de variantă I pentru acest tip de sferocitoză, chiar dacă definirea se realizează deocamdată pe o anomalie funcțională. Ținînd seama de forțele concentrate, după toate probabilitățile suportul molecular va fi în curînd precizat.

Nu este exclus, ca alte variante ale bolii să fie provocate prin anomalii diferite de cea detectată. Una dintre ele a fost descrisă în două cazuri și se traduce prin imposibilitatea de extracție a spectrinei din ansamblul citoscheletic (287). Altele ar putea să rezulte dintr-o perturbare a echilibrului dimer-tetramer. Deocamdată nu se întrevede posibilitatea existenței unor forme comparabile cu sferocitoza de la șoarecii cu deficiență în spectrină. Cînd spectrina normală de la șoarece este încorporată în sferocite prin hemoliză hipotonă și reînchidere, fantomele dobîndesc o serie de proprietăți ale celulelor normale. Astfel, deși forma de sferocit persistă, se reduce tendința de fragmentare a membranei și de fuziune în medii hipertone conținînd lizolecitină. De asemenea, se normalizează comportarea la stresul hipoton, ceea ce întărește ideea rolului spectrinei în stabilizarea membranei (292).

Deși descoperirea defectului molecular în varianta comună a sferocitozei ereditare este încă în investigare, apare posibilă o extrem de interesantă relație. Astfel, alterarea permeabilității pentru cationi ar sugera că determinanții permeabilității active și pasive pentru Na^+ sînt genetic în legătură.

Pe de altă parte, se presupune că există sferocitoze ereditare nedatorate unei anomalii a spectrinei, dar probele sînt mai puțin concludente. Astfel, pe vezicule eritrocitare inversate s-a observat o fixare redusă a complexului spectrină-actină, ceea ce ar însemna o reducere a locurilor de legare. Întrucît legarea complexului se produce cu ankirina, anomalia s-ar putea situa la nivelul acesteia (149). O altă anomalie ar putea afecta segmentul intern al benzii 3; de asemenea a fost presupusă, dar nu a fost probată direct, o fixare diminuată a ankirinei la banda 3.

În Japonia, mai mulți autori au semnalat o diminuare importantă, pînă la dispariție, a proteinei 4.2 pe geluri efectuate după tehnica Fairbanks (142). Deși anomalia a fost descrisă la un număr mare de subiecți, ea nu a

Scanned with OKEN Scanner

fost confirmată de alte laboratoare. Este cazul, probabil, al unei variante geografice (39).

Implicarea spectrinei și a interacțiunii sale cu celelalte componente ale citoscheletului în „debilitatea" membranei din cadrul sferocitozei este o certitudine. Din păcate, probele definitive sînt greu de obținut, deoarece spectrina este o moleculă enormă (circa 4070 de aminoacizi într-un dimer) și defectul molecular ar putea fi provocat doar de o singură substituție a unui aminoacid sau de inversarea poziției sale în lanțul primar polipeptidic.

Alte cercetări se referă la *eliptocitoza ereditară*, boală relativ răspîndită, eterogenă genetic și hematologic, în care peste 20% din hematii sînt deformate către o elipsă, producîndu-se un gen de ovalizare a discocitului eritrocitar. Hemoliza este redusă și apare în 10—15% din cazuri, la majoritatea pacienților durata de viață a globulelor roșii fiind normală (121, 201). În stadii avansate apar în sîngele periferic poikilocite, sferocite și fragmente celulare sub formă de vezicule, ceea ce reflectă tulburări ale stabilității membranei și ale formei celulelor. Defectele sînt localizate la nivelul citoscheletului. Proteinele componente ale acestei structuri sînt cantitativ normale la electroforeză pe gel de poliacrilamină-SDS, dar anormale calitativ. Astfel, cînd spectrina izolată și purificată normală este denaturată prin încălzire, se detectează doi subcomponenți: 65% ± 3% din spectrină este labilă și denaturată la 49° ± 0,3°C, restul fracțiunii rămînînd stabilă pînă la 54°C. Această eterogenitate observată la denaturarea termică a spectrinei este urmărită prin tehnici de microcalorimetrie și rămîne neexplicată. Spre deosebire de spectrina normală, cea provenind de la unii pacienți suferind de eliptocitoză ereditară este în întregime labilă la variațiile de temperatură și anormal sensibilă la căldură. Denaturarea sa la 48°C ± 0,1 în loc de 49°C înseamnă o diferență semnificativă față de normal ($p < 0{,}0005$). La acești pacienți fragmentarea globulelor roșii și sferocitoza se produc, ca urmare, la 48°C în loc de 49°C (201).

În afara implicării spectrinei, există date, mult mai puține, asupra unor cazuri de eliptocitoze constituționale cu anomalii ale proteinei 4.1 (7, 101).

Datorită diversității anomaliilor spectrinei eliptocitozele din acest grup pot fi împărțite în 3 tipuri (39).

Tipul I reprezintă aproape jumătate din cazuri. Hiperhemoliza poate lipsi, sau este ușoară și bine compensată. Ovalocitoza poate atinge 100%, rareori se pun în evidență poikilocite. Anomaliile spectrinei sînt susținute, la acest tip, de următoarele date: a) prin extracția spectrinei la 4°C la forță ionică slabă se constată sistematic un exces de dimeri de spectrină, 15—30% față de 5—10% la martorii normali; b) la proba de tetramerizare *in vitro* se constată constant un defect al transformării dimer-tetramer, cu prăbușirea constantei de asociere (care la normali este $6 \cdot 10^5\ M^{-1}$ în timp ce la bolnavi scade la $1—3 \cdot 10^5\ M^{-1}$); c) digestia proteolitică fracționată a spectrinei purificate este anormală, furnizînd un fragment de 80 000 daltoni diminuînd cantitativ, contrastînd cu creșterea unui fragment de 72 000 d (69, 195); d) proba de stabilitate termică arată o scădere a temperaturii de denaturare a spectrinei la 47—48°C, în loc de 49°C la normal.

Aceste date sugerează cu pregnanță existența unei mutații structurale la nivelul fragmentului de 80 000 d care constituie capătul lanțului și

poartă locurile de interacțiune dimer-dimer. Anomaliile menționate, sînt suficiente pentru a explica instabilitatea citoscheletului membranei, ca și gradul variabil de hemoliză.

Tipul II este reprezentat de *piropoikilocitoza ereditară*, o boală rară, identificată recent, în 1975 (356). Unii autori o consideră drept entitate clinică separată, deoarece spre deosebire de celelalte forme de poikilocitoză constituțională, în sîngele periferic globulele roșii sînt profund modificate, coexistînd celule cu spiculi, fragmente celulare, sferocite, eliptocite, triangulocite și alte variante de poikilocite. Fenomenul patognomonic este sensibilitatea termică deosebită a eritrocitelor. După o perioadă de încălzire (15 minute) piropoikilocitele se fragmentează la 45—46°C în loc de 49°C. La o încălzire prelungită fragmentele celulare persistă și la temperatura normală a organismului. S-a constatat că fosforilarea *spectrinei* este mult deprimată în fantomele eritrocitare, dar activitatea spectrinchinazei devine normală pe substrat exogen, ceea ce probează un defect la nivelul substratului. Defectul spectrinei a fost probat și prin criterii furnizate de dicroismul circular. Piropoikilocitoza ereditară este însoțită și de o creștere a influxului de Ca^{2+} și de o legare excesivă a aceluiași cation la nivelul membranei (348).

Piropoikilocitoza ereditară se deosebește de tipul I prin intensitatea hemolizei, explicată prin instabilitatea mai mare a citoscheletului, deoarece în rest, în linii mari s-au constatat anomalii similare ale spectrinei (195). Este curios că această boală nu a fost descrisă la subiecții negri.

Tipul III corespunde unei observații unice, dar fundamentală, deoarece comportă prima demonstrație categorică a unei anomalii structurale a moleculei de spectrină (87). Observația se referă la 2 bolnavi, fiică și tată, purtători ai unei hemolize moderate și ai unei eliptocitoze cu poikilocitoză. La ambii subiecți s-a detectat existența unui lanț β al spectrinei anormal, transmis heterozigot și reprezentînd 50% din lanțurile totale β. Anomalia structurală constă în scurtarea lanțului β prin absența unui peptid de circa 6 000 d. Absența totală a fosforilării la nivelul lanțului afectat, conduce la localizarea pe acest peptid a locurilor normale de fosforilare a spectrinei. Dimerul format de lanțul β normal cu lanțul β anormal este total incapabil să se lege la un alt dimer pentru a forma un tetramer, ceea ce probează necesitatea integrității segmentului capital al lanțului β în procesul de tetramerizare. Mecanismul genetic, deși încă nedemonstrat, ar putea fi deleția unui segment important al genei de structură a lanțului (87).

Eliptocitozele constituționale cu *anomalii ale proteinei 4.1* sînt mai puțin descrise în literatură. Primele două cazuri au fost puse în evidență în 1980, în Franța (7, 395).

Într-un caz, proteina 4.1 era complet absentă la bolnav și diminuată la circa 50% la ambii părinți. Anomalia pare să se transmită cu caracter recesiv și ar putea fi dată de prezența unei alele mute. În alt caz, pacientul, un copil părea să fie dublu heterozigot: pe de o parte o alelă mută transmisă de tată, la care banda 4.1 era diminuată cu circa 50%, iar pe de altă parte o bandă 4.1 scurtată și regăsită cu un dublet în poziție anormală la bolnav și la mama sa, la care, banda 4.1 normală era de asemenea diminuată cu 50% (7). În altă observație (americană) deficitul în banda 4.1 era asociat cu dispariția unei glicoproteine, gliconectina, care ar servi la ancorarea benzii 4.1 cu restul membranei (221).

Scanned with OKEN Scanner

Recent s-a descoperit un model animal, o linie de cîini la care se asociază o anemie hemolitică cu un deficit al proteinei 4.1. Se furnizează astfel proba că absența proteinei are drept consecință o instabilitate a scheletului membranei și o hiperhemoliză (302).

La aproape jumătate dintre bolnavii cu eliptocitoză constituțională nu s-a decelat nici o anomalie. Observațiile fenomenologice ale celulelor (instabilitatea, rigiditatea, reducerea Ca^{2+} și a altor cationi, scăderea vieții în circulație) reflectă probabil anomalii ale citoscheletului.

În cadrul *hemoglobinopatiilor* este cuprinsă una dintre cele mai investigate boli la nivel molecular, poate cea mai cercetată din toată patologia, *drepanocitoza*, denumită încă și *anemie falciformă* sau *siclemie*. Boala este ereditară și familială, iar tulburările rezultă din prezența hemoglobinei S, în eritrocite. Foarte răspîndită, îndeosebi în Africa (5—20% din populație) ea se caracterizează prin apariția hematiilor în formă de seceră, datorită polimerizării HbS. Mecanismele acestei deformări au fost mult studiate, astfel încît, în prezent cauzele moleculare ale siclemiei sînt perfect explicate. Hemoglobina drepanocitară, denumită HbS, spre a o deosebi de HbA normală, conține valină în locul glutamatului la nivelul poziției 6 a lanțului. De aceea, posedă de 2—4 ori mai multe sarcini pozitive pe moleculă, iar hemoglobina deoxigenată a bolnavilor devine de circa 25 de ori mai solubilă decît hemoglobina deoxigenată normală. În anumite condiții HbS poate precipita, ca urmare hematiile se deformează sub formă de seceră. Fără a prezenta bazele moleculare ale acestui proces vom menționa că distorsiunea microfilamentelor de HbS, sau legarea de membrană a agregatelor de HbS, vor avea ca efect o creștere a permeabilității pentru cationi și, deci, o încărcare celulară cu cationi, cu o sporire compensatorie a pompei cationice și, probabil, o depleție de ATP (124). Ca rezultat al creșterii Ca^{2+} intracelular se produc alterări ale membranei care conduc la un eflux de K^+ (efectul Gardos) și în continuare o scădere globală a cationilor intracelulari, cu deshidratarea celulelor (xerocitoză) și creșterea concentrațiilor intracelulare de hemoglobină. Ultimul fenomen conduce la o descreștere a afinității pentru oxigen și o reducere a timpului de deformare falciformă. Ciclul de deformare siclemică ireversibilă rezultă din perturbările membranei și îndeosebi ale citoscheletului. Scheletul „distorsionat" conține cantități normale de spectrină, actină, proteine ale benzilor 3 și 4.1, iar HbS lipsește, ceea ce demonstrează că deformarea ireversibilă din drepanocitoză este dată de modificări calitative în structura și organizarea uneia sau a mai multor proteine. La microscopia electronică nu au fost însă distinse anormalități în organizarea citoscheletului. S-a încercat descrierea unor stadii de deformare ireversibilă în siclemie (237, 238), într-o primă etapă hematiile sînt doar ușor deshidratate și relativ flexibile. În stadiul următor este vizibilă o deformare a eritrocitelor de tip echinocitic, o deshidratare moderată, crește conținutul în Ca^{2+}, ATP-ul fiind normal sau ușor redus. Modificările Ca^{2+} și ATP nu sînt suficiente pentru a produce o agregare detectabilă de spectrină sau *cross-linking* al acesteia. Dimpotrivă, în stadiul al III-lea continuă deshidratarea globulelor roșii, acumularea de Ca^{2+}, depleția de ATP și se produce o agregare sau *cross-linking* în cazul spectrinei. Cunoașterea modificărilor scheletului membranei eritrocitare va întregi imaginea, deja amplă, a fenomenelor moleculare din drepanocitoză.

Scanned with OKEN Scanner

Hemoliza prin agenți oxidanți se datorează sensibilității spectrinei la acești agenți, explicată prin faptul că molecula prezintă grupări sulfhidril expuse în afara citoscheletului. Expunerea de scurtă durată a globulelor roșii intacte sau a fantomelor eritrocitare la diverși oxidanți duce la legarea dimerilor și tetramerilor de spectrină în complexe cu benzile 2 și 4.9, iar în unele experimente la formarea de agregate de spectrină cu masă moleculară mare. Asemenea complexe au fost puse în evidență și în hematiile circulante la subiecții splenectomizați cu deficiență severă de glucoză-6-fosfat-dehidrogenază (G6PD) și cu hemoliză cronică. Circa 1% din totalul proteinelor membranei sînt cuprinse în dimeri aglomerați de spectrină, ori în complexe moleculare cu greutate moleculară foarte mare formate din spectrină și proteine din banda 4.5.

Nu se știe încă dacă fenomenele de *cross-linking* ale proteinelor din citoschelet sînt prezente și în alte boli caracterizate prin producția exagerată de agenți oxidanți, sau printr-un deficit în mecanismele fiziologice de apărare împotriva acestor agenți (237).

O serie de alte boli în care hematia este afectată, candidează de asemenea la clasificarea în perturbări ale scheletului membranei eritrocitare, dar nu există încă suficiente argumente experimentale în acest sens. De exemplu, în *stomatocitoza ereditară*, din motive insuficient cunoscute, membrana este extrem de permeabilă pentru cationi, îndeosebi pentru Na^+, rezultînd o acumulare de Na^+ și apă în exces, cu reducerea K^+. Defectele probabile ale citoscheletului sînt sugerate de următoarele observații: a) imidoesterii, care induc un *cross-linking* al spectrinei, suprimă stomatocitoza și reduc permeabilitatea pentru Na^+, normalizînd durata de viață a hematiilor; b) șoarecii cu deficiență în spectrină prezintă o concentrație intraeritrocitară de Na^+ crescută; c) aldehida acetică provoacă formarea de complexe actină-spectrină și conversia hematiilor de la forma biconcavă la cea de stomatocit; d) fosforilarea spectrinei în fantomele eritrocitare, provenind din sîngele pacienților cu stomatocitoză ereditară este semnificativ redusă (408).

La unii pacienți s-a observat creșterea lipidelor totale per celulă, îndeosebi a fosfatidilcolinei (410). S-a mai pus în evidență o deficiență a benzii 7, ca și o proteină anormală la electroforeza bidimensională (188).

În prezent există tendința ca în orice situație patologică însoțită de deformări eritrocitare să se cerceteze și posibila participare a citoscheletului. Inventarul modificărilor spectrinei și actinei ca determinanți ai rezistenței membranei, formei și flexibilității eritrocitului este doar în curs de concretizare. Concomitent, nu trebuie ignorați nici ceilalți determinanți ai formei eritrocitare, menționați anterior.

În realitate, gama variantelor genetice (îndeosebi ale hemoglobinei) cu afectarea membranei este mult mai amplă.

7.3. Alterări ale membranei eritrocitare secundare unor boli

În această secțiune vom prezenta cîteva date asupra modificărilor globulului roșu în cadrul unor boli cu expresie clinică în alte țesuturi și organe. Alterările constatate, deși vizează atît structura cît și îndeosebi funcțiile membranei eritrocitare, nu prejudiciază durata de viață a hematiei și nici capacitatea acesteia de a transporta oxigen. Biopsia globulelor roșii fiind

Scanned with OKEN Scanner

ușor realizabilă, informațiile obținute prin studiul proprietăților modificate ale acestora pot fi utile în diagnostic și în sfatul genetic. Aceasta deoarece cele mai multe din bolile declanșatoare ale alterărilor eritrocitare au un caracter genetic, Se conturează, deci, utilizarea eritrocitului ca *marcher*, or, tentativa detectării unor indicatori relevanți și accesibili în diagnosticul clinic de rutină este o tendință exprimată net în medicina contemporană. Totodată, ținînd seama de faptul că o serie de caracteristici structurale și proprietăți de transport de la nivelul membranei eritrocitare sînt în mare măsură similare cu cele ale membranelor celorlalte celule, globulul roșu se atestă ca un model util în explicarea unor aspecte clinice importante. Uneori au fost obținute pe această cale chiar date relevante pentru patogenia unor boli. Deoarece ne referim exclusiv la membrana eritrocitară, vom menționa doar faptul că globulele roșii sînt utile, de asemenea, în înțelegerea și diagnosticul unor boli metabolice ca galactozemia, deficiența de hipoxantin-guanin-riboziltransferază, porfiria acută intermitentă și altele.

7.3.1. *Endocrinopatii reflectate la nivelul membranei eritrocitare*

Interferarea structurii și funcțiilor membranei eritrocitare în bolile endocrine, deși clar atestată experimental, este uneori greu de explicat din cel puțin două motive: a) ea se produce și în cazul unor hormoni pentru care nu există receptori la nivelul membranei; b) prezența adenilatciclazei în globulele roșii mature este controversată; poate că lucrările recente care ridică fosfatidilinozitolul la „rang" de mesager secund în transducția mesajelor generate de complexul ligand-receptor, vor contribui la noi clarificări.

Vom enumera doar cîteva din bolile endocrine sau endocrino-metabolice în care modificările membranei eritrocitare pot prezenta un interes, inclusiv pentru medicul practician.

În *hipertiroidism* s-au constatat atît la om cît și la animale o serie de modificări. Prima alterare detectată constă într-o creștere a Na^+ intracelular (300). Ulterior, noi am investigat (în colaborare cu Laboratorul de biofizică al Facultății de Medicină Grange-Blanche, Universitatea Claude Bernard, Lyon) captarea eritrocitară de ^{86}Rb la hipertiroidieni, ca analog al captării K^+ (268), pe două loturi de subiecți: sănătoși (10) și hipertiroidieni (22). La ultimii, starea patologică a fost controlată prin captarea ^{131}I, tiroxină și indice al tiroxinei libere. Prezentăm rezultatele în fig. 44. Am constatat o scădere a captării ^{86}Rb în hipertiroidism în raport cu subiecții normali. Deoarece transportul de ^{86}Rb reflectă transportul de K^+, acest efect poate fi explicat printr-un defect al pompei de $Na^+ — K^+$ care determină o inabilitate în compensarea difuziei extracelulare de K^+ (fig. 44 A). Ulterior, au fost emise și alte explicații, dintre care cea mai plauzibilă pare interferarea sistemului (Na^+, K^+) ATP-ază în termogeneza sporită, din cadrul bolii, rezultînd prin aceasta reducerea disponibilităților sale în transportul Na^+ și K^+.

În fig. 44 B, este reprezentată captarea ^{86}Rb în diferite condiții. Două observații merită atenție: a) la globulele roșii normale, concentrații de litiu de 3 mM și 6 mM provoacă o scădere marcată a captării, care este amplificată de ouabaină ($10^{-4}M$). Observația apare în contradicție cu alte date care susțin o stimulare a pompei de sodiu de către litiu (125). Discrepanța ar putea fi explicată prin condiții experimentale diferite, în particular concentra-

ția de K^+. Dimpotrivă, litiul nu are efect asupra captării ^{86}Rb eritrocitare provenind de la bolnavi.

Alte cercetări, incitate de scăderea în hipertiroidism a colesterolului plasmatic au condus la detectarea unei creșteri a colesterolului la nivelul membranei eritrocitare. Fenomenul este atribuit sporirii transferului net al colesterolului din plasmă la nivelul membranei eritrocitare (266).

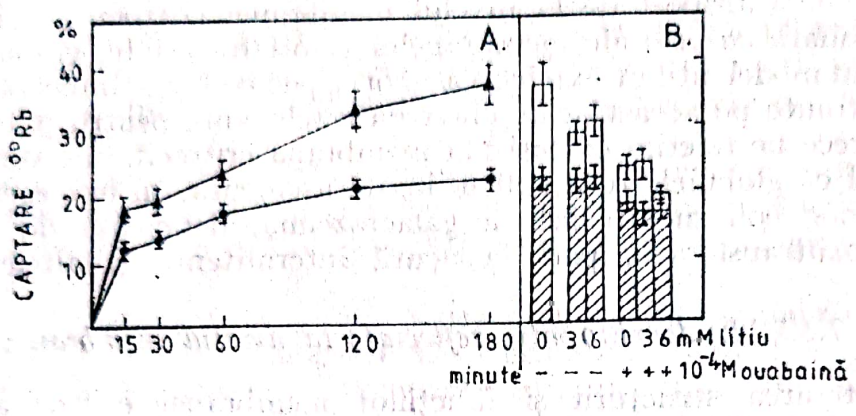


Fig. VII. 44 — A: Captarea 86Rb de eritrocite provenind de la subiecți normali (graficul superior, triunghiuri) și de la pacienți hipertiroidieni (graficul inferior, cerculețe). Media + deviația standard pentru 10 și, respectiv, 22 de experimente. *B*: Efectul litiului 3 și 6 nM) și al ouabainei (10^{-4} M) asupra ^{86}Rb — captării eritrocitare după 180 minute de incubare, la normali și hipertiroidieni (zonele hașurate). Media + DS. (Date personale) (268).

În *pseudohipoparatiroidism*, corelat genetic cu cromozomul X, țesuturile țintă (oase, rinichi) nu mai răspund la parathormon. Se știe că în cazul parathormonului interacțiunea între receptor și adenilatciclază este mediată de „proteina de cuplare" denumită proteina N, care leagă guaninnucleotizi. Deși la nivelul eritrocitului nu a fost demonstrată existența receptorilor pentru parathormon, surprinzător, proteina N apare ca o proteină integrală a membranei eritrocitare, cu un domeniu citoplasmatic, Acest fragment monomeric are greutatea moleculară de 42 000 d. La majoritatea pacienților cu pseudohipoparatiroidism se constată o reducere pronunțată, cu circa 50% a conținutului normal în proteine N al membranei (304). Constatarea este utilă în explicarea unor semne clinice care exprimă afectarea în cadrul bolii, a altor organe, îndeosebi tiroida și tubii colectori renali. Prezumptiv, deficiența de proteină N din membrană ar fi generalizată la nivelul mai multor tipuri de celule și în acest fel s-ar produce perturbarea acțiunii unor hormoni ca tirotropina și ADH.

Diabetul zaharat, după cum se știe, se caracterizează frecvent prin scăderea legării insulinei pe receptorii specifici, la nivelul celulelor hepatice și al adipocitelor, cu un rol fiziologic important. Același fenomen a fost demonstrat pe limfocite (239). Eritrocitele de om leagă, de asemenea, insulina, iar la diabetici se constată o reducere cu 10—15% a legării hormonului, cu păstrarea afinității normale pentru receptor (83). Noi am constatat o diminuare a legării insulinei la vîrstnici și obezi, în comparație cu adulții normali (a se vedea cap. IX).

Importanța funcțională a insulinei la nivelul globulelor roșii este neclară, dar legarea hormonului respectă aparent multe modificări din alte țesuturi.

Scanned with OKEN Scanner

Citäm, din bibliografia vastă referitoare la acest subiect: creşterea legării insulinei în anorexia nervoasă ca şi în tratamentul cu antidiabetice chimice; dimpotrivă, în insuficienţa renală legarea eritrocitară a insulinei scade şi pare a se corecta prin hemodializă (117, 155, 230).

7.3.2. *Psihozele maniaco-depresive*

Modificările transportului eritrocitar de litiu în *psihozele maniaco-depresive* au fost intens cercetate. Vom menţiona doar două consecinţe care decurg din numeroasele lucrări dedicate acestei teme: a) valoarea raportului eritro-plasmatic al litiului în terapie; b) obţinerea de rezultate clare în favoarea faptului că psihozele bipolare reprezintă un sindrom eterogen, idee care se reflectă în încercările actuale de explicare a patogeniei bolii afective.

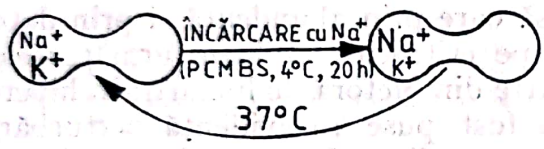
7.3.3. *Hipertensiunea arterială esenţială*

Hipertensiunea arterială esenţială a incitat, în încercările de clarificare a patogeniei, controverse care sînt greu de egalat. În orice caz, rolul membranei celulare în producerea încărcării celulare cu sodiu este tot mai mult luat în considerare. Din bibliografia, apăsătoare prin abundenţă şi prin date contradictorii obţinute cel mai frecvent pe eritrocite, reţinem următoarele (cu menţiunea că vom cita doar o mică parte din pletora de lucrări): în hipertensiunea arterială esenţială (HTE) au fost puse în evidenţă perturbări variate ale transportului de sodiu, iar datele în discordanţă au fost explicate prin polimorfismul modalităţilor de transport, descrise anterior, pe lîngă faptul că există mari variaţii interindividuale. Aceste variaţii sînt dependente de factori etnici şi geografici, ceea ce a condus la conturarea unei epidemiologii a bolii. În continuare vom prezenta o sinteză a rezultatelor care atestă alterări ale transportului de sodiu în HTE, urmărind 3 aspecte: a) modificări ale pompei de $Na^+ - K^+$; b) variaţii ale celorlalte forme de transport; c) dacă alterarea transportului de sodiu în HTE este genetică sau dobîndită; d) existenţa unor inhibitori ai transportului de sodiu în circulaţie.

a) Atestarea *modificărilor pompei de* $Na^+ - K^+$ ouabaïn-sensibilă ar putea fi proba decisivă. Primele cercetări care atestau încărcarea eritrocitelor cu sodiu datează din 1952 (325); ulterior au apărut numeroase lucrări în care se tentează explicarea fenomenului. Recent (1986) P. J. Hilton reuneşte datele din 20 de publicaţii, cuprinzînd 965 pacienţi cu HTE şi 1857 normali. Analiza statistică relevă o creştere semnificativă a valorii sodiului intraeritrocitar la hipertensivi, cu o diferenţă de 13%. Se constată însă o mare variaţie a datelor obţinute de la un laborator la altul, care se explică prin: tehnicile de măsurare diferite, deosebiri importante între alcătuirea loturilor de hipertensivi şi martori sănătoşi sau pur şi simplu prin şansă! De asemenea, unele lucrări nu conţin corelaţii între presiunea sanguină medie şi utilizarea medicamentelor antihipertensive, ambele putînd influenţa căile transportului celular de sodiu. Toate aceste dubii se referă la eritrocite, în timp ce în cazul leucocitelor rezultatele sînt unanime în ceea ce priveşte creşterea nivelului de sodiu intracelular, ca o consecinţă a reducerii activităţii pompei de $Na^+ - K^+$ (150).

O probă experimentală decisivă poate fi reprezentată de măsurarea cu ajutorul ouabaînei marcate a situsurilor active ale ATP-azei de la suprafața celulelor. Rezultatele de pînă acum nu sînt pe deplin edificatoare.

b) *Variațiile celorlalte forme de transport insensibile la ouabaină* au fost luate în considerare îndeosebi datorită lucrărilor lui R. P. Garay și P. Meyer, care au avut ideea utilizării unui agent chimic ce provoacă o încărcare artificială a celulelor cu sodiu, la 4°C. Resuspendate într-un mediu fiziologic, la 37°C, globulele roșii își refac configurația normală a repartiției Na^+ și K^+, dar viteza de expulsie a sodiului este semnificativ redusă la hipertensivi, în comparație cu subiecții normali. Autorii citați au propus chiar un test, pentru evaluarea riscului de HTE la copiii descendenți din familii cu hipertensivi (fig. 45). Ulterior, ei au demonstrat experimental că micșorarea extruziei de sodiu are la bază un defect al cotransportului furosemid-senzitiv. Alți autori, au confirmat această supoziție, deși există și date contradictorii, atribuite diferențelor metodologice (118, 119, 120, 213).



EXPULZIE DE Na^+ / INFLUX DE K^+
(PRIN RELUAREA ACTIVITĂȚII POMPEI)

Fig. VII. 45 — Un test controversat propus de R. P Garay și P. Meyer (118) : eritrocitele sînt încărcate cu Na^+, prin incubare *in vitro* cu un derivat mercurial (PCMBS), timp de 20 ore, la 4° C. Ulterior, hematiile sînt reintroduse într-un mediu de suspensie fiziologic, la 37° C. Pompele membranare își reiau activitatea, Na^+ fiind expulzat, iar K^+ redevenind mai concentrat în celule. Se afirmă că viteza de expulzie a Na^+ este diminuată la subiecții hipertensivi și la copiii descendenți din hipertensivi. Ar exista, deci, o anomalie transmisă genetic a pompei, care detectată la copii ar putea motiva o serie de măsuri profilactice. Testul nu a fost, însă, confirmat definitiv.

Urmărind experimental o altă formă de transport insensibilă la ouabaină și anume, contratransportul Na^+ — Li^+, M. Canessa și colab. au descris rate înalte ale acestui tip de transport, la subiecții cu HTE (52, 56, 57). Numeroase lucrări au confirmat că acest sistem este crescut la pacienții hipertensivi.

c) Problema *dacă alterarea transportului de sodiu în HTE este genetică sau dobîndită* rămîne esențială. Acceptînd anomaliile descrise anterior ca fiind dobîndite, rolul lor fiziopatologic devine cert, dimpotrivă, considerarea acelorași perturbări drept marcher genetic nu implică includerea lor, în mod necesar, în nici un mecanism important.

În realitate, în ceea ce privește factorii genetici studii extinse au demonstrat absența oricărei anomalii la o proporție importantă de descendenți din familii de hipertensivi. Pe de altă parte, dacă alterările transportului de sodiu sînt strict legate de hipertensiune, ar trebui să nu se producă și la persoane normotensive. De asemenea, considerînd o legătură negenetică între celulele sanguine și celulele implicate direct în procesul hipertensiv ar trebui să existe un factor detectabil în plasmă. Această ipoteză, așa cum se va vedea s-a materializat.

M. Canessa și colab. susțin, pe baza studiului a 23 familii de tip caucazian cuprinzînd fiecare cei doi părinți și descendenți, că în timp ce nu există nici o relație între ereditate și modificările pompei de Na^+ — K^+,

alterările contratransportului de $Na^+ - Li^+$ și ale cotransportului de $Na^+ - K^+$ sînt de origine genetică în 70% din cazuri. Există, deci, din acest punct de vedere, un risc genetic pentru hipertensiune. Concluzia enunțată trebuie însă, acceptată cu prudență, deoarece au fost puși în evidență numeroși factori nongenetici de afectare a contratransportului $Na^+ - Li^+$: la pacienții cu hemodializă cronică, în hipokaliemii, în efortul fizic intens ș.a. Ratele crescute ale contratransportului sînt mai deficil de demonstrat în cazurile de hipertensiune arterială limită *(bordeline)* (52, 56, 57, 59).

d) *Existența unor inhibitori ai transportului de sodiu în circulație* este tot mai frecvent invocată. Primele experiențe au fost simple: s-au suspendat în probe de plasmă, sau ser sanguin provenind de la pacienții hipertensivi, eritrocite sau limfocite de la donorii sănătoși. S-a constatat o creștere a încărcării celulelor cu sodiu, ceea ce a condus la concluzia existenței în plasmă sau ser, la bolnavii cu HTE a unui factor perturbant al transportului cationului. Pe leucocite s-a probat că serul hipertensivilor inhibă pompa de sodiu, magnitudinea efectului fiind proporțională cu anormalitățile transportului de sodiu observate la leucocitele bolnavilor de la care provenea serul, existînd, de asemenea, o relație cu gradul de creștere a presiunii diastolice (252).

Aceste rezultate au contribuit și mai mult la atribuirea unui rol central alterărilor sodiului în patogenia hipèrtensiunii. S-a postulat intervenția unui hormon natriuretic, ipoteză lansată de multă vreme, a cărui existență a fost probată în 1983, prin izolarea și purificarea sa de către M. Cantin și J. Genest (60). Factorul natriuretic atrial conține o parte activă constituită din 28 de aminoacizi și o punte disulfidică între două reziduri de cisteină, această punte fiind foarte importantă pentru activitatea moleculei. Hormonul activ circulant este decupat dintr-un precursor polipeptidic mai lung constituit din 151 de acizi aminați la om și 152 la șobolan. Pe modele animale (șobolani predispuși genetic la hipertensiune arterială) s-a constatat o creștere importantă a concentrației hormonului în sînge, interpretată; ca o tentativă a organismului de a diminua presiunea arterială. La nivel renal, factorul natriuretic ar diminua procesul de reabsorbție a sodiului, dar mecanismul de acțiune nu este deocamdată cunoscut, fiind acceptată o inhibare a pompei de sodiu. Se știe doar, prin autohistoradiografie, că el este mai activ la nivel glomerular în raport cu alte zone ale nefronului, iar un fenomen paradoxal rămîne nerelevarea unui consum de energie metabolică, deși se presupune interacțiunea la nivelul celulelor țintă prin intermediul unui sistem mesager secund, de tipul GMP-ciclic (60). Inhibarea de către hormonul natriuretic a pompei de sodiu s-ar putea produce, în afara rinichiului, și la nivelul altor celule din organism, inclusiv eritrocit, dar ipoteza rămîne să fie demonstrată.

Un aspect frecvent luat în discuție îl reprezintă rolul ionilor de calciu: inhibiția pompei de sodiu ar putea rezulta din reducerea ușoară a potențialului de membrană ca urmare a creșterii influxului de calciu prin canalele specifice. O altă ipoteză constă în existența, în numeroase țesuturi, a unui mecanism de schimb sodiu-calciu, îndeosebi în cazul mușchilor netezi (305).

Se consideră că inhibitorul circulant al pompei de sodiu din HTE are proprietăți identice cu glicozizii cardiaci, ceea ce înseamnă posibilitatea unei competiții cu glicozizii cardiaci pe situsurile de legătură de la nivelul biomembranelor. Confirmînd această presupunere, M. A. Devynck și colab. au

Scanned with OKEN Scanner

raportat alterări semnificative ale legării ouabaïnei pe membranele eritrocitare normale, după expunerea lor la ser sanguin provenind de la hipertensivi (85).

Datele menționate, mult comprimate din rațiuni de conciziune, atestă rolul proceselor de transport transmembranar de sodiu în HTE. Nesincronismul deplin al datelor, sau chiar controversele existente, rezultă atît din polimorfismul proceselor de transport, cît și din extrema diversitate a materialului biologic utilizat. În orice caz, încercarea de descifrare a patogeniei HTE la nivel molecular reprezintă cea mai amplă abordare interdisciplinară a acestei probleme majore din patologia umană, membrana eritrocitară fiind utilizată frecvent ca model experimental.

Asupra anomaliilor membranelor eritrocitare în neuropatologie există referiri multiple în capitolul VIII.

Cu aceasta inventarul modificărilor membranei eritrocitare în diferite boli, atestînd o extrem de interesantă comportare în rezonanță cu o serie de procese din organism, nu este epuizat. Încheiem cu o afirmație recentă, efectuată cu umor (133): „eritrocitul este mai mult roșu decît mort" (așa cum s-a susținut uneori) și de aceea reprezintă, îndeosebi prin membrana sa, o sursă continuă de date noi, utile în explicarea la nivel molecular a proceselor patologice.

Bibliografie selectivă

1. ABABEI L., MOISIU M. — Blut, 1970, 20, 363.
2. ADRAGNA N. C., CANESSA M. L., SOLOMON H., SLATER E., TOSTESON D. C. — Hypertension, 1982, 4, 795.
3. AGRE P., BENNETT V. — J. Supramolec. Struct. Cell Biochem., 1981, Suppl. 5, 130.
4. ALBERTS B., BRAY D., LEYWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D. — Biologie moléculaire de la cellule, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1986, pp. 266—271.
5. ALLAN D., COCKCROFT S. — Biochem. J., 1983, 213, 555.
6. ALLARD W. J., LIENHARD G. E. — J. Biol. Chem., 1085, 260, 8668.
7. ALLOISIO N., DORLEAC E., DELAUNAY J., GIROT R., GALAND C., BOIVIN P. — Blood, 1980, 60, 265.
8. ALVAREZ J., GARCIA-SNACHO J., HERREROS B. — Biochim. Biophys. Acta, 1986, 860, 25.
9. AMREIN P. C., FRIEDMAN R., KOSINCKI K., ELLMAN L. — J. Amer. Med. Assoc., 1979, 214, 2190.
10. ANDERSON J., TYLER J. M. — J. Biol. Chem., 1980, 255, 1259.
11. ANSELSTETTER V. — Blut, 1978, 36, 135.
12. ANSTEE D. J., TANNER M. J. A. — Vox Sang., 1975, 29, 378.
13. ATKINSON M., MORROW J., MARCHESI V. — J. Cell Biochem., 1982, 18, 493.
14. AVRUCH J., FAIRBANKS G. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1216.
15. BACHMAN L. — J. Cell Sci., 1986, 80, 281.
16. BALLAS S. K. — Amer. J. Med. Sci., 1978, 276, 4.
17. BALLAS S. K. — J. Clin. Invest., 1978, 61, 1097.
18. BALLAS S. K., KRASNOW S. H. — Ann. Clin. Lab. Sci., 1980, 10, 209.
19. BEAVEN G. H., JEAN-BAPTISTE L., UNGEWICKELL E., BAINES A. J., SHAHBAKHTI F., PINDER J. C., LUX S. E., GRATZER W. B. — Eur. J. Cell Biol., 1985, 36, 299.
20. BENDER W. W., GARAN H., BERG H. C. — J. Mol. Biol., 1971, 58, 783.
21. BEAUGÉ L., LEW V. L. — In Membrane Transport in Red Cells, (sub red. J. C. Ellory, V. L. Lew), Academic Press, 1977, pp. 39—51.
22. BEAVEN G. H., GRATZER W. B. — Biochim. Biophys. Acta, 1980, 600, 140.

Scanned with OKEN Scanner

23. BENGA GH. — Biologia moleculară a membranelor cu aplicații medicale, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
24. BENGA GH. — Biologia celulară și moleculară, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1985.
25. BENGA G., POP V. I., POPESCU O., IONESCU M., MIHELE V. — J. Membrane Biol. 1983, 76, 129.
26. BENGA GH., POPESCU O., POP V. I., BORZA V., MUREȘAN A., HODÂRNĂU A. BENGA I., HOLMES R. P. — în FEBS Advances Course „Biomembranes and Disease Cluj-Napoca, 1986, p. 72.
27. BENNETT V. — J. Cell Biochem., 1982, 18, 49.
28. BENZ R., TOSTESON M. T., SCHUBERT D. — Biochim. Biophycs. Acta, 1984, 775, 347.
29. BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P., LACROIX J. C. — Biologie et physiologie cellulaire, vol. I, Hermann, Paris, 1977.
30. BERNSTEIN R. E. — J. Clin. Invest., J. Clin. Invest., 1985, 38, 1572.
31. BESSIS M., WEED R. I., LEBLOND P. F. — Red Cell Shape, Springer-Verlag, Berlin, New York, 1973.
32. BEUTLER E., GINTO E., JOHNSON C. — Blood, 1976, 48, 887.
33. BIDET J. M., GILBERT M., GHEYNELL J., DUCHEUNE-MARULLAZ J., LEMARIÉ J. C. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1981, 41, Suppl. 156, 189.
34. BIRCHMEIER W. — TIBS ,1984, 9, 192.
35. BIRCHMEIER W., SINGER S. J. — J. Cell Biol., 1977, 73, 647.
36. BLADIER D., PERRET G., PRÉ J., CORNILLOT P. — Ann. Biol., Clin., 1981, 39, 109.
37. BLAUSTEIN M. P., HAMLYN J. M. — Amer. J. Med., 1984, 5, 45.
38. BOIVIN P. — La Nouv. Presse Méd., 1982, 11, 2347.
39. BOIVIN P. — Path. Biol., 1984, 32, 717.
40. BOIVIN P., GARBAZ M. — C. R. Soc. Biol., 1980, 174, 605.
41. BOON N. A., ARONSON J. K., HALLIS K. F. — Clin. Sci., 1984, 66, 569.
42. BORGERS M., THONE F. J. M., XHONENUX B. J. M., DE CLERK F. F. P. — J Histochem. Cytochem., 1983, 31, 1109.
43. BOROCHOV H., ABBOTT R. E., SCHACTER D., SHINITZKY M. — Biochemistry 1979, 18, 251.
44. BRANTON D. — Annu. Rev. Plant. Physiol., 1969, 20, 209.
45. BRANTON D., COHEN C. M., TYLER J. — Cell., 1981, 24, 24.
46. BRENNESSEL B. A., GOLDSTEIN J. — Vox Sang., 1974, 26, 405.
47. BRETSCHER M. S. — Nature New Biol., 1973, 236, 11.
48. BRETSCHER M. S. — Pour la Science, 1985, 98, 66.
49. BREWER G. J. — Med. Clin North America, 1980, 64, 579.
50. BROWN A. M., LEW V. L. — J. Physiol., 1983, 343, 455.
51. BROWN P. A., FEINSTEIN M. B., SHAAFI R. I. — Nature, 1975, 254, 523.
52. BRUGNARA C., CANESSA M., CUSI D., TOSTESON D. C. — J. Gen. Physiol., 1986 87, 91.
53. BULL B. S., BRAISLFORD J. D. — Blood, 1973, 41, 833.
54. BURSAUX E., POYART C. — Bull . Eur. Physiopath. Resp., 1983, 19, 345.
55. CABANTCHIK Z. I., ROTHSTEIN A. — J. Membr. Biol., 1974, 15, 207.
56. CANESSA M. — în Erythrocyte Membrane 3: Recent Clinical and Experimental Advances (sub red. W. C. Kruckenberg), Alan R. Liss, New York, 1984, p. 293—315.
57. CANESSA M., ADRAGNA N., SOLOMON H. S., CONNOLLY T. M., TOSTESON D. C. — N. Engl. J. Med., 1980, 302, 772.
58. CANESSA M., BIZE I., SOLOMON H. S. — Clin. Exp. Hypertens., 1981, 3, 783.
59. CANESSA M., BRUGNARA C., CUSI D., TOSTESON D. C. — J. Gen. Physiol., 1986 87. 113.
60. CANTIN M., GENEST M. — Pour la Science, 1986, 102, 43.
61. CARRAWAY K. L., KOBYLKA D., SUMMERS J. — Chem. Phys. Lipids, 1972, 8, 65
62. CARTER D. P., FAIRBANKS G. — J. Cell Biochem., 1984, 24, 385.
63. CASSOLY R. — Biochim. Biophys Acta., 1982, 689, 203.
64. CAVIERES J. D. — în Membrane Transport in Red Cells, (sub red. J. C. Ellory, V. L. Lew), Academic Press, 1977, pp. 1—37.
65. CHAPMAN D. — Qurt. Rev. Biophys., 1975, 8, 183.
66. CHIEN S. — în The Red Blood Cell, sec. edit., vol. II, (sub red. D. N. Mc. Surgenor), Academic Press, New York, 1975, pp. 1031—1133.
67. CHIE H.-R., WILLIAMSON P., RUBIN E., SCHLEGEL R. A. — Cell Biol., Int. Rep., 1985, 9, 957.

Scanned with OKEN Scanner

111. FUNG L. W. M. — Biochemistry, 1981, 20, 7162.
112. FURTHMAYR H. — J. Supramol. Struct., 1978, 9, 79.
113. FURTHMAYR H., MARCHESI V. T. — Biochemistry, 1976, 15, 1137.
114. GAHMBERG C. G., HOKOMORI S. I. — J. Biol. Chem., 1973, 248, 4311.
115. GALLE P. — Ann. Physique, 1985, 10, 287.
116. GALLE P. — La Recherche, 1986, 17, 766.
117. GAMBHIA K. K., ARCHER J. A., NERURKAR S. G., CRUZ I. A., SANDERS J. — Nephron, 1981, 28, 4.
118. GARAY R. P., ELGHOZI J.-L., DAGHER G., MEYER P. — N. Engl. J. Med., 1980, 302, 769.
119. GARAY R. P., MEYER P. — Lancet, 1979, I, 349.
120. GARAY R. P., NAZARET C., DOGHER G., BERTRAND E., MEYER P. — Clin. Exp. Hypertension, 1981, 3, 861.
121. GARBAZ M., DHERMY D., BOIVIN P. — Path. Biol., 1981, 29, 627.
122. GARY-BOBO C. M., SOLOMON A. K. — J. Gen. Physiol., 1971, 57, 283.
123. GEORGE FORTES P. A. — in Membrane Transport in Red Cells, (sub red. J. C. Ellory, V. L. Lew), Academic Press, New York, 1977, pp. 175—195.
124. GLADER B. E., NATHAN D. G. — Blood, 1978, 51, 983.
125. GLEN A. I. M., BRADOURY M. W. B., WILSON J. — Nature, 1972, 239, 399.
126. GLOMSET J. A., NICHOLS A. V., NORUM K. R., KING W., FORTE T. — J. Clin. Invest., 1973, 52, 1078.
127. GODIN D. V., GRAY G. R., FROHLICH J. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1978, 38, 162.
128. GOLDSTEIN J. — Clin. Immunol. Allergy., 1984, 4, 489.
129. GOODMAN S. R., SHIFFER K. — Am. J. Physiol., 1983, 244, C121.
130. GOODMAN S. R., SHIFFER K., COLEMAN D. B., WHITFIELD C. F. — in The Red Cell, Alan R. Liss, New York, 1984, pp. 415—439.
131. GOPINATH R. M., VINCENZI F. F. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 77, 1203.
132. GRATZER W. B. — Muscle Nonmuscle Motil., 1983, 2, 37.
133. GRATZER W. B. — Nature, 1984, 310, 368.
134. GREEN F. A., JUNG C. Y., CUPPOLETTI J., OWENS N. — Biochim. Biophys. Acta, 1981, 648, 225.
135. GUIDOTTI G. — Annu. Rev. Biochem., 1972, 41, 731.
136. GUIDOTTI G. — Alfred Benzon Symp., 1980, 14, p. 300.
137. GUIDOTTI G. — in Physiology of Membrane Disorders, Second Edit. (sub red. J. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S. G. Schultz), Plenum Medical Book Comp., New York, and London, 1986, pp. 45—55.
138. HAAKER H., RACKER E. — J. Biol. Chem., 1979, 254, 6598.
139. HAEST C. W. M. — Biochim. Biophys. Acta, 1982, 694, 331.
140. HAGERMAN J. S., GOULD R. G. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 78, 349.
141. HANAHAN D. J. — in Red Cell Membrane (sub red. G. A. Jamieson, T. J. Greenwalt), J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1969, pp. 88—92.
142. HAYASHI S., KOOMOTO R., YANO A., ISHIGAMI S., TSUJINO G., SAEKI S., TANAKA T. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 57, 1038.
143. HEGNER D., PLATT D., HECKERS H., SCHLOEDER U., BREUNINGER V. — Mech. Ag. Developm., 1979, 10, 117.
144. HELFRICH W., DEULING H. J. — J. Phys., 1975, 36-C1, 327.
145. HENTSCHEL W. M., WU L. L., TOBIN G. O., ANSTALL H. B., SMITH J. B., WILLIAMS R. R., OWEN ASH K. — Clin. Chim. Acta, 1986, 157, 33.
146. HERZBERG V., BOUGHTER J. M., CARLISLE S., HILL D. E. — Nature, 1980, 286, 279.
147. HESPEL P., LIJNEN P, FIOCHHI R., VAN OPPENS S., VANDEN EYNDE E., AMERY A. — Eur. J. Appl. Physiol., 1986, 55, 24.
148. HIGGINS J. A., FLORENDO N. T., BARNETT R. J. — J. Ultrastruct. Res., 1973, 42, 66.
149. HILL J. S., SAWYER W. H., HOWLETT G. S., WILEY J. S. — Biochem. J., 1981, 201, 259.
150. HILTON P. J. — N. Engl. J. Med., 1986, 314, 22.
151. HIRATA F., AXEBROD J. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 2348.
152. HODGKIN A. K., KEYNES R. D. — J. Physiol. (London), 1975, 128, 61.

Scanned with OKEN Scanner

323. TAO M., CONWAY R. G. — în: Membrane Abnormalities and Disease, vol. I (sub red. M. Tao), CRC Press, Inc., Boca Raton Florida, 1982, pp. 43—90.
324. TEITEL P. — Nouv. Rev. Fr. Hémat., 1967, 7, 195.
325. TOBIAN L. jr., BINION J. T. — Circulation, 1952, 5, 754.
326. TOMASELLI M. B., JOHN K. M., LUX S. E. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 1911.
327. TOMITA M., MARCHESI V. T. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2964.
328. TOSTESON D. C. — în: Red Cell Membrane (sub red. G. A. Jamieson, T. J. Greenwalt), J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1969, pp. 291—317.
329. TSUKITA S., TSUKITA S., ISHIKAWA H. — J. Cell Biol., 1980, 85, 567.
330. TYLER J. M., HARGREAVES W. R., BRANTON D. — Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 1979, 76, 5192.
331. VALENTINE W. N. — Blood, 1977, 49, 241.
332. VAN DEENEN L. L. M., DE GIER J. — în: The Red Blood Cell, vol. I (sub red. D. N. McSurgenor), Academic Press, New York 1974, pp. 148—211.
333. VAN MEER G., POORTHIMS B. J. H. M., WIRTZ K. W. A., OP DEN KAMP I. A. F., VAN DEENEN L. L. M. — Europ. J. Biol. Chem., 1980, 103, 283.
334. VÎLCU AL. — Eritrocitul, Ed. Medicală, București, 1977.
335. WANG A. J., KIEHART D. P., POLLARD T. P. — J. Biol. Chem., 1985, 260, 46.
336. WANG J.-F., FALKE J. J., CHAN S. I. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 3277.
337. WARDLE E. N. — Cell Surface Science in: Medicine and Pathology, MTP Press LTD. Lancaster, 1985.
338. WATKINS W. M. — în: The Red Blood Cell, vol. I (sub red. D. N. McSurgenor), Academic Press, New York, 1974, pp. 294—360.
339. WAUGH R. E. — Cell Motil., 1983, 3, 609.
340. WEDER A. N., TORRETTRI B. A., JULINS S. — Hypertension, 1984, 6, 115.
341. WEED R. I. — Semin. Hematol., 1970, 7, 249.
342. WEINSTEIN R. S. — în: Red Cell Membrane (sub red. G. A. Jamieson, T. J. Greenwalt), J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1969, pp. 36—82.
343. WEINSTEIN R. S. — în: The Red Blood Cell, vol. I (sub red. D. N. McSurgenor), Academic Press, New York, 1974, pp. 214—269.
344. WHEELER T. J., HINKLE P. C. — Ann. Rev. Physiol., 1985, 47, 503.
345. WHITE M. D., RALSTON G. B. — Biochim. Biophys. Acta, 1980, 599, 569.
346. WIEDENMANN B., ELBAUM D. — Blood, 1982, 60, suppl. 1, 26 a.
347. WIETH J. O., BJERRUM P. J. — J. Gen. Phsyiol., 1982, 79, 253.
348. WILEY J. S. — în: Membrane Transport in Red Cells (sub red. J. C. Ellory, V. L. Lew), Academic Press, New York., 1977, pp. 337—361.
349. WILLIAMSON P., BATEMAN J., KAZARSKY K., MATTOCKS K., HERMANOWICZ N., CHOE H. -R., SCHLEGEL R. A. — Cell, 1982, 30, 725.
350. WILLIAMSON P., MATTOCKS K., SCHLEGEL R. A. — Biochim. Biophys. Acta, 1983, 732, 387.
351. WOLFE L. C., JOHN K. M., FALCONE J. C., BYRNE A. M., LUX S. E. — N. Engl. J. Med., 1982, 307, 1367.
352. YAMAKAWA T., NAGAY Y. — TIBS, 1978, 3, 128.
353. YOUNG J. D., ELLORY J. C. — J. Neurol. Transm., 1979, Suppl. 15, 139.
354. YU J., FISCHMAN D. A., STECK T. L. — J. Supramolec. Struct., 1973, 1, 233.
355. ZAI S. S. — Br. J. Haematol., 1977, 37, 399.
356. ZARKOWSKY H. S., MOHANDAS N., SPEACKER C. B. — Brit. J. Haematol., 1975, 29, 537.

Scanned with OKEN Scanner

VIII. Membranele în neuropatologie

„Strategia urmată în investigațiile noastre ne-a permis să afirmăm că defectul există în mai multe sisteme de organe și că elucidarea mecanismelor biochimice responsabile de anormalitățile de la nivelul hematiilor și celulelor din culturi de țesuturi va conduce la identificarea defectului genetic primar care în țesutul muscular este cauza distrofiei și miotoniei. Este clar că tehnologia curentă a ADN recombinat poate rezolva problema locusului genetic al erorilor din aceste boli. Totodată, pentru înțelegerea expresiei fenotipice a acestor defecte genetice trebuie să se includă explicarea alterărilor structurii și funcțiilor membranei în bolile menționate".

G. A. PLISHKER, S. H. APPEL (1986)

Geneza, conducerea, transferul și modularea semnalelor nervoase în circuitele neuroneuronale și neuroefectoare sînt în mod esențial condiționate de caracteristicile structural-funcționale ale membranei celulelor excitabile ce alcătuiesc aceste circuite. Potențialul de acțiune autopropagat — cea mai evidentă componentă a semnalului nervos — este rezultatul fluctuațiilor de gradient ionic transmembranar. Aceste fluctuații, rezultate din activitatea fazică a unor structuri membranare specializate (canale, transportori, ionofori, pompe ionice etc.), transformă informațiile din mediu în mesaje complex codificate ce se transmit de la o celulă la alta. Comunicarea neuronală și declanșarea răspunsului motor (muscular, secretor etc.) se realizează în majoritatea cazurilor prin procesele neurochimice ale transmiterii sinaptice. Definite ca zone de contact neuronal sau neuroefector sinapsele reprezintă în esență specializări membranare. La acest nivel, mediatorul, eliberat prin mecanisme de membrană presinaptice, acționează asupra receptorilor specifici din membrana postsinaptică, asigurînd reluarea transmiterii mesajului nervos sau declanșarea răspunsului motor. Pînă și răspunsul motor, consecință a activității celulare globale, este în bună parte condiționat de mecanismele membranare postsinaptice cu rol de inițiere și modulare.

Avînd în vedere larga participare a membranelor celulare în desfășurarea funcțiilor de bază ale structurilor excitabile, este lesne de înțeles de ce orice perturbare la acest nivel poate declanșa mecanisme patogenice cu răsunet important în apariția unor sindroame și afecțiuni neurologice. Cele ce urmează reprezintă o încercare de a aprofunda aceste aspecte prin exemplificări concrete. Cum nu intră în vederile noastre realizarea unui tratat de neurologie clinică, vor fi subliniate doar faptele relevante în ceea ce privește intervenția disfuncției membranare în tabloul clinic general al unor afecțiuni.

Scanned with OKEN Scanner

1. DATE SELECTIVE PRIVIND FUNCȚIONALITATEA MEMBRANELOR EXCITABILE (NEURONALE, MUSCULARE)

Fără a mai relua detaliile legate de arhitectura moleculară și compoziția membranei nervoase și musculare descrise în alte capitole, cele de față se vor limita doar la succinta trecere în revistă a unor date privind bazele ionice ale potențialului de repaus și acțiune, excitabilitatea și conductibilitatea, transmiterea sinaptică etc. Aceste informații vor fi limitate la volumul necesar clarificării aspectelor patologice ce constituie obiectul principal al capitolului de față.

1.1. Bazele ionice ale potențialului de repaus

Diferența de potențial electric dintre interiorul și exteriorul membranei celulare în repaus este generată de inegalitatea de concentrație ionică dintre mediul intra- și cel extracelular. Această inegalitate este menținută prin factori pasivi (permeabilitatea selectivă, echilibrul Donnan) și factori activi (transportul activ prin ATP-aza (Na^+—K^+)-dependentă) (fig. 1, tabel I)

Matricea lipidică a membranelor (a se vedea capitolul respectiv) nu permite traversarea liberă (în gradiente pasive de concentrație, electrice etc.) a substanțelor hidrosolubile și în primul rînd a ionilor. Această traversare se

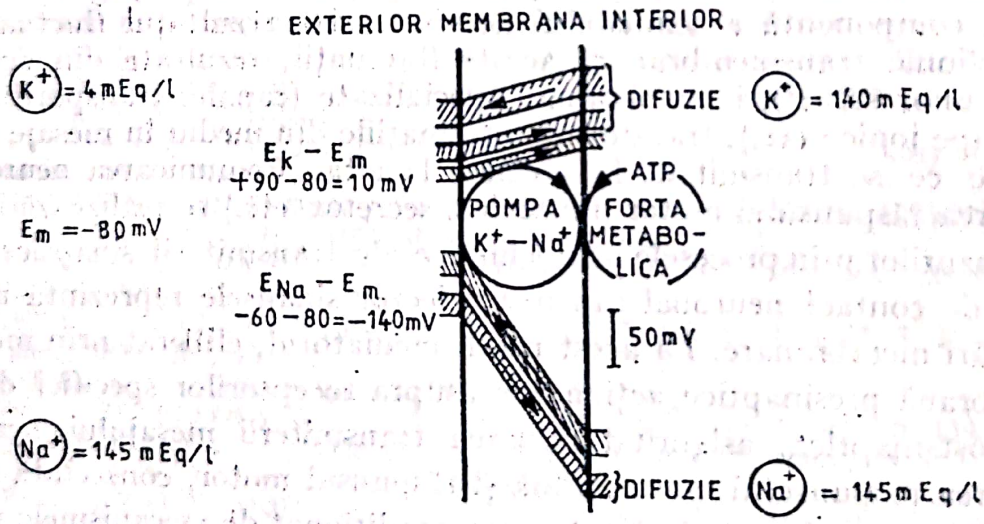


Fig. VIII. 1 — Mecanismele electrochimice ale potențialului membranar de repaus.

realizează cu participarea unor structuri membranare ce asigură transportul pasiv: canalele ionice, transportorii și ionoforii. În geneza potențialului de repaus (dar și a celui de acțiune), datele existente implică în primul rînd intervenția canalelor ionice. Acestea sînt structuri proteice transmembranare (proteine integrale) care pot crea căi hidrofile omogene ce traversează membrana ca un tunel, asigurînd traiectul apos necesar difuziunii pasive a unor molecule simple sau ioni. Pînă în prezent sîntem încă departe de a fi obținut o descriere

Scanned with OKEN Scanner

TABEL I

Concentrații ionice și potențiale de echilibru membranar

Specia ionică	Concentrație (10^{-3} mol/l)		Potențialul de echilibru (mV)
	Intracelular	Extracelular	
Clor	9	102	−70
Potasiu	140	9	−90
Sodiu	12	145	+60

completă a acestor canale sau măcar de o identificare a principalelor tipuri. Cel puțin cîteva tipuri de canale sînt însă destul de bine cunoscute mergîndu-se pînă la izolarea proteinei din care fac parte și înregistrarea fluxurilor de curent prin unități izolate (metoda de *„patch clamp"*). Este vorba de canalele de Na^+, K^+ și unele canale de Ca^{2+}. Datele de microelectrofiziologie, combinate cu cele obținute prin utilizarea de liganzi și inhibitori specifici (tetrodotoxină — TTX — pentru canalele de Na^+; tetraetilamoniu și 4-aminopiridina pentru canalele de K^+; etc.), separarea și reinserția acestor proteine în membrane artificiale au demonstrat caracterul în general specific al acestor canale. Selectivitatea este dată de caracteristicile moleculei proteice precum și de existența unei bariere de selectivitate în interiorul structurii. Astfel, în cazul proteinei de 250.000 de daltoni cu formă cilindrică (17 nm lungime, 4,1 nm diametru) care formează canalul de Na^+, bariera (filtrul) de selectivitate ar fi reprezentată de o zonă de construcție ($0,3 \times 0,5$ nm) delimitată de un inel de oxigeni carboxilici electronegativi care resping anionii și atrag cationii. Această regiune ar fi situată la primul sfert extern al distanței dintre cele două extremități. Dilatația externă permite fixarea unor blocanți, cum ar fi TTX sau saxitoxina (STX), în timp ce dilatația internă permite fixarea altor blocanți cu diametrul de cel puțin 0,8 nm (procaină). În afara barierei de selectivitate, canalele ionice se caracterizează și prin existența unei bariere de permeabilitate (fenomen de *„gating"*), care creează posibilitatea unor fluctuații, a unor tranziții între una sau mai multe conformații deschise sau închise ale canalului. Cu alte cuvinte, canalele ionice membranare nu sînt deschise permanent. Ele se deschid și se închid ritmic în funcție de fluctuațiile barierei de permeabilitate din interior (fig. 2). Aceste tranziții închis-deschis și invers sînt controlate de numeroși factori, cum ar fi voltajul (potențialului) transmembranar, blocarea sau activarea de către diferite subsanțe endo-sau exogene. S-a descris și posibilitatea unor ample fluctuații conformaționale spontane. În cazul în care canalele sînt cuplate în membrană cu receptori specifici, formînd agregate moleculare complexe, deschiderea canalului poate fi declanșată prin activarea receptorului de către semnalul chimic specific din mediul extracelular (hormon, mediator etc.)

Faptul că în condiții de repaus numărul canalelor de Na^+ active (permeabile) este foarte redus în comparație cu cel al canalelor de K^+, face ca membrana celulară să fie practic impermeabilă pentru Na^+ (permeabilitate selectivă).

În aceste condiții, repartiția pasivă a ionilor permeanți (mai ales K^+) în gradientele de concentrație și electrice (echilibrul Donnan), de o parte și de alta a membranei, determină apariția unei diferențe de potențial (potențial

Scanned with OKEN Scanner

de repaus) a cărei menținere este asigurată prin mecanismele transportului activ de $Na^+—K^+$. Potențialul de repaus transmembranar poate fi considerat ca reprezentînd suma potențialelor de echilibru pentru principalele specii ionice aflate în mediul extra- și intracelular (Na^+, K^+, Cl^-) în funcție de permeabilitatea membranei pentru fiecare tip de ion. Prin potențial de echilibru al unui

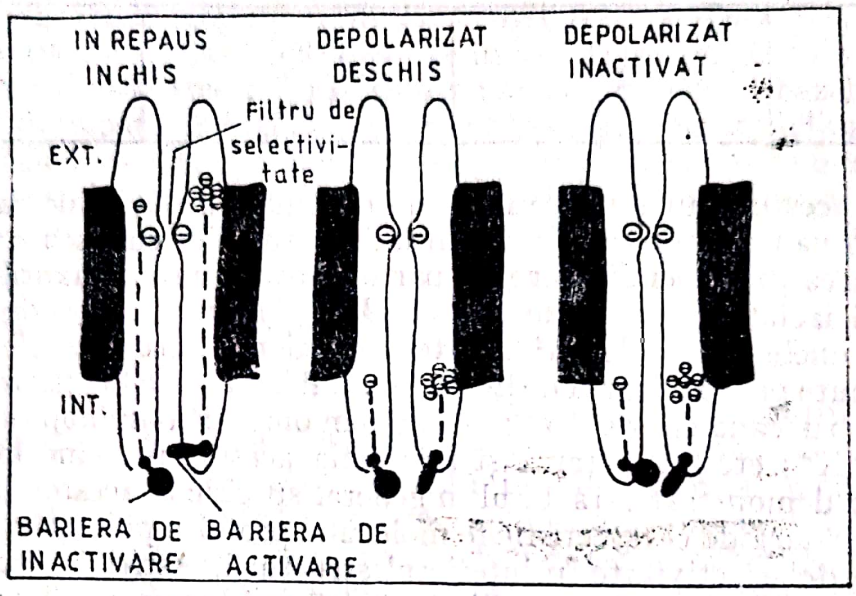


Fig. VIII. 2 — Canalul de sodiu voltaj-dependent, reprezentat schematic (modificat după Kuffler și colab., 1984).

ion (E) se înțelege diferența de potențial realizată prin repartiția la echilibru a unui ion pe cele două fețe ale membranei și poate fi calculat prin ecuația Nernst:

$$E = 61 \log \frac{(I^{+/-})i}{(I^{+/-})e}$$

În aceste condiții, potențialul de repaus al membranei (Em) poate fi calculat în funcție de concentrațiile ionice (Na^+, K^+, Cl^-) și permeabilitatea pentru acești ioni (P) cu ajutorul ecuației Goldman, Hodgkin, Katz:

$$Em = \frac{RT}{F} \log \frac{P_K(K^+)\,e + P_{Na}(Na^+)\,e + P_{Cl}(Cl^-)\,i}{P_K(K^+) + P_{Na}(Na^+)\,i + P_{Cl}(Cl^-)e}$$

1.2. Bazele ionice ale potențialului de acțiune

Atingerea pragului de excitație determină declanșarea unui fenomen membranar exploziv, a cărui expresie electrică este potențialul de acțiune (fig. 3). Fenomenele s-ar desfășura în ordine astfel:

1.2.1. *Perioada de latență*

Perioada de latență: reprezintă intervalul de timp dintre momentul stimulării și începutul potențialului de acțiune. Are o durată redusă (0,1

msec pentru majoritatea structurilor) și, în cursul său, potențialul de membrană se deplasează progresiv de la valoarea de repaus la valoarea pragului de excitație. În acest moment se deschid canalele de Na^+ voltaj-dependente și permeabilitatea pentru ionii de Na^+ (conductanța la Na^+, g Na^+) crește rapid de la valoarea de repaus, apropiată de 0,1 la valori maxime de cîteva sute de ori mai mari.

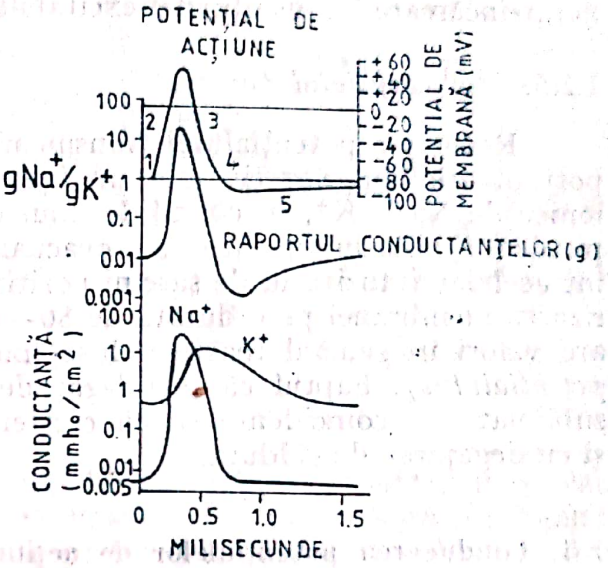


Fig. VIII. z — Modificarea conductanțelor pentru Na^+ și K^+ în cursul potențialului de acțiune. Fazele potențialului sînt numerotate ca în text.

1.2.2. *Depolarizarea*

După perioada de latență, influxul în avalanșă al ionilor de Na^+ determină o depolarizare totală a membranei, continuată cu o trecere în zona valorilor pozitive denumită *„overshoot"*. Apare o deflexiune pozitivă cu amplitudinea de circa 100—120 mV, ce atinge vîrful în interval de aproximativ 1 msec.

1.2.3. *Repolarizarea rapidă*

Acumularea masivă de Na^+ în interior acționează ca o frînă, reducînd la nivelul vîrfului undei pătrunderea acestui ion. Se închid canalele de sodiu și conductanța membranei pentru acest ion revine la valoarea de repaus. Ionii de Na^+ pătrunși rămîn astfel fixați în interiorul celulei și potențialul se menține aproape de valoarea de vîrf pînă în momentul în care începe al doilea fenomen declanșat de excitație și anume creșterea de 10—40 ori a conductanței de K^+. În acest moment ionii de K, împinși de diferențe de concentrație și încărcare, părăsesc celula iar potențialul revine spre zona valorilor negative (repolarizare). În structurile nervoase, conductanța la K^+ începe să crească la circa 1 msec după potențialul de acțiune. Datorită acestui fapt, repolarizarea începe abrupt, chiar de la vîrf *(spike-potențial)*. În alte structuri (fibra miocardică) creșterea conductanței la K^+ începe cu o oarecare întîrziere, fapt ce determină apariția unui platou de durată variabilă.

1.2.4. *Postpotențialul negativ*

Postpotențialul negativ se manifestă ca o întîrziere a repolarizării ce devine mai lentă față de perioada inițială, rapidă. Acest postpotențial se datorează excesului de sodiu intracelular, menținut prin permeabilitatea scăzută

față de ion. Acest exces nu poate fi compensat rapid prin ieșirea K^+ a cărui conductanță, atingînd valoarea maximă, începe să revină spre normal. La sfîrșitul acestei perioade, compensarea excesului de sodiu se realizează prin două mecanisme. Primul este reprezentat de fenomenul de difuziune ionică dinspre zona imediat adiacentă membranei spre restul citoplasmei. Pomparea activă a sodiului spre exterior rămîne mecanismul principal, deși mai lent, de „reîncărcare" a membranei excitabile.

1.2.5. *Postpotențialul pozitiv.*

Revenirea potențialului transmembranar la valori de repaus la sfîrșitul postpotențialului negativ este un fenomen tranzitoriu. Activitatea pompei ionice de $Na^+—K^+$, în condițiile unui exces de sodiu intracelular și a unei pierderi a potasiului, face ca evacuarea sodiului să determine un deficit intracelular tranzitoriu de sarcini pozitive, Acest deficit determină hiperpolarizarea membranei pe o durată de 80—100 msec. Acest postpotențial pozitiv are valori în general foarte reduse (maximum 1—2% din valoarea *spike-potențialului*). Faptul că este legat de activitatea de transport activ este subliniat de coincidența sa cu creșterea consumului energetic al nervului și cu degajarea de căldură.

1.3. Conducerea potențialelor de acțiune

3.1. *Conducerea în fibrele nervoase amielinice*

Faptul că fibrele nervoase conduc potențialul de acțiune a determinat compararea lor cu un cablu electric. De fapt, caracteristicile lor electrice departe de a fi ideale (miezul conducător cu rezistență mare și învelișul izolator cu rezistență ineficientă), le fac de 10^{12} ori mai puțin eficace decît orice cablu electric utilizabil, Posibilitatea de a conduce unde de depolarizare este conferită fibrelor nervoase de faptul că reprezintă un cablu electric în a cărui structură sînt inserați practic continuu, amplificatori biologici care susțin nedecrementțial amplitudinea potențialului condus. Acești amplificatori sînt reprezentați de jocul permeabilității ionice ce stă la baza apariției potențialului de acțiune.

Mecanismul conducerii influxului nervos se realizează prin așa zișii curenți locali, descriși pentru prima oară de Hermann (1879). În momentul producerii potențialului de acțiune, pe o anumită lungime a membranei (lungime „de undă" a influxului nervos: 16—60 mm), are loc o inversare a potențialului de membrană.

Pe fața internă a membranei în zona respectivă apare de exemplu un potențial de +40 mV, în timp ce la numai cîteva zecimi de milimetri potențialul este la valoarea de repaus — 80 mV. Sub acțiunea acestei diferențe de potențial, cationii transportori de sarcină migrează spre zona polarizată (în repaus,) și acumulîndu-se la acest nivel, determină depolarizarea. Circuitul este completat prin membrană și mediul extracelular, unde sarcinile se vor deplasa dinspre regiunea aflată în repaus spre zona inițial depolarizată (fig. 4) În momentul în care depolarizarea realizată prin acest circuit local atinge

Scanned with OKEN Scanner

pragul, se declanşează mecanismele ionice care generează un nou potenţial de acţiune în zona imediat învecinată. În acelaşi timp, prin mecanismele repolarizării în zona iniţială se restabileşte potenţialul de repaus. În acest mod, potenţialul de acţiune se propagă autoregenerativ şi nedecremential din aproape în aproape.

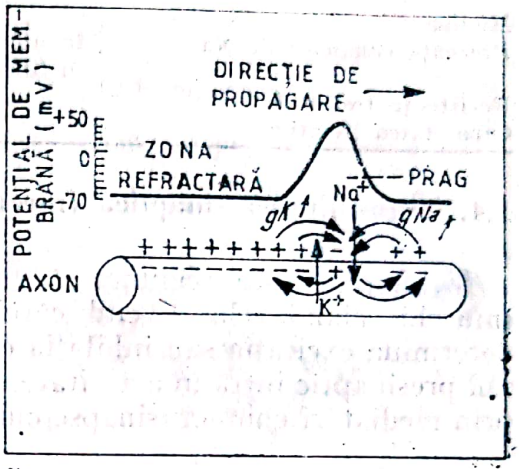


Fig. VIII. 4 — Curenţii locali Hermann în fibra amielnică (modificat după Kuffler şi colab. 1984).

Din mecanismul descris rezultă că în fibra nervoasă conducerea se realizează în ambele direcţii (conducerea indiferentă). Viteza de conducere depinde de distanţa la care se poate propaga electrotonic potenţialul de acţiune Această distanţă (constantă de spaţiu) este proporţională cu „lungimea de undă" a influxului nervos şi este în general foarte redusă. Din acest motiv şi viteza influxului nervos în fibrele amelinice este scăzută (de ex. 5m/sec în axoni cu diametrul de 30 μm).

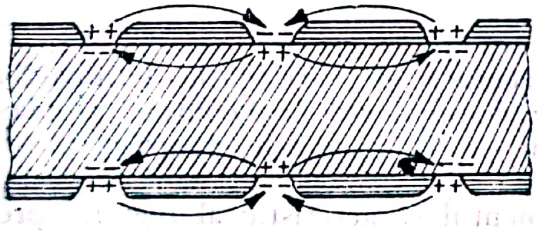


Fig. VIII. 5 — Propagarea saltatorie a excitaţiei într-un axon mielinizat (modificat după Vasilescu şi Mărgineanu, 1979).

1.3.2. *Conducerea saltatorie în fibrele nervoase mielinizate*

Viteze mari de conducere nervoasă sînt realizate la nivelul fibrelor nervoase mielinizate. Potenţialul de acţiune se propagă saltatoriu de la o strangulaţie Ranvier la următoarea. Acest mod de propagare este determinat de existenţa unor diferenţe importante între zona nodurilor şi cea a internodurilor (a se vedea tabelul alăturat şi fig. 5).

Excitabilitatea crescută a nodurilor determină apariţia cu uşurinţă a potenţialelor de acţiune care se propagă electronic pînă la nodul următor. Faptul că internodul este impermeabil la sodiu, precum şi capacitatea sa redusă, limitează pierderile de amplitudine ale potenţialului în cursul propagării electrotonice. În acest mod, depolarizarea ce „sare" la nodul următor rămîne suficientă (cel puţin 50%) pentru a declanşa amplificatorul nodal ce generează un nou potenţial de acţiune. Pierderea tecii de mielină sub acţiunea toxinei difterice sau în cazul sclerozei multiple duce la scăderea vitezei de propagare sau chiar pierderea capacităţii de conducere.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL II

Caracteristici comparative ale nodurilor și internodurilor în fibra nervoasă mielinizată

	Noduri	Internoduri
Mielina	absentă	prezentă
Prezența canalelor de Na^+	în număr mai mare (×500) decît în fibra amelinică	absente
Rezistența (relativă)	1	10
Capacitatea (relativă)	1000	1

1.4. Transmiterea sinaptică (mecanisme generale)

Sinapsa este regiunea de contact neuroneuronal sau neuroefector (mușchi, glandă) la nivelul căreia există diferențieri morfofuncționale ce determină excitația sau inhibiția elementului postsinaptic, atunci cînd neuronul presinaptic intră în activitate. Transmiterea se realizează cel mai frecvent prin mediatori chimici (sinapse chimice) și mai rar electric (sinapse electrice).

1.4.1. *Caracterele morfofuncționale generale ale sinapselor cu transmitere chimică* (fig. 6)

Orice sinapsă este alcătuită dintr-o regiune presinaptică și una postsinaptică, separate printr-un spațiu sinaptic. Prima descriere electronooptică se datorează lui Palade și Palay (1954).

1.4.1.1. *Regiunea presinaptică*

Regiunea presinaptică este reprezentată de terminația butonată a axonului ce stabilește contactul sinaptic. Butonul terminal conține citoplasmă, un număr variabil de mitocondrii (4—9), veziculele sinaptice și este limitat de o membrană.

Veziculele sinaptice reprezintă elementul caracteristic al regiunii presinaptice. Importantă modalitate de stocare a substanțelor mediatoare, ele derivă din reticulul endoplasmatic. Forma, densitatea și dimensiunile acestor vezicule variază în funcție de mediatorul conținut.

1.4.1.2. *Spațiul sinaptic*

Spațiul sinaptic este spațiul de 200 Å cuprins între cele două membrane pre- și postsinaptică. La nivelul său s-au pus în evidență filamente cu orientare transversală ce asigură adezivitatea regiunii sinaptice și ar putea reprezenta un sistem de ghidaje pentru moleculele de mediator care îl traversează.

1.4.1.3. *Regiunea postsinaptică*

Regiunea postsinaptică reprezintă o porțiune diferențiată a membranei și citoplasmei periferice a elementului postsinaptic (neuron, mușchi, glandă). Membrana postsinaptică este în general mai densă electronooptic și conține structurile receptoare caracteristice mediatorului folosit.

Scanned with OKEN Scanner

Principalele caracteristici funcționale ale sinapselor chimice sînt următoarele:

— Unidirecționalitatea
— Întîrzierea sinaptică
— Potențarea posttetanică
— Fatigabilitatea
— Inexcitabilitatea electrică a membranei postsinaptice.

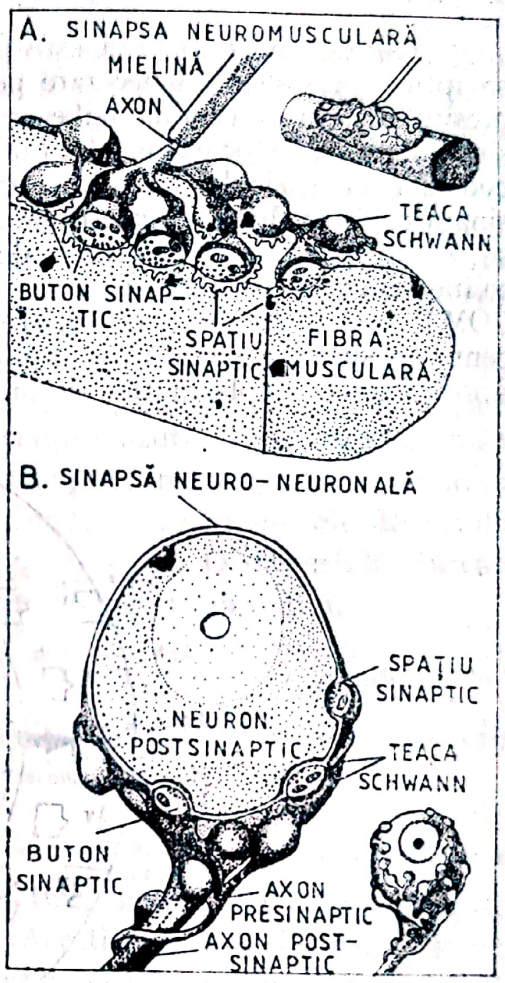


Fig. VIII. 6 — Aspecte structurale ale sinapselor chimice. A. Placa motorie într-o fibră musculară scheletică de șarpe. B. Sinapsă ganglionară în cordul de broască (modificat după Kuffler și colab. 1984).

1.4.2. *Etapele fundamentale ale transmiterii sinaptice*

Mecanismul transmiterii chimice a fost examinat și descris în detaliu la nivelul joncțiunii neuromusculare, una dintre cele mai abordabile și elementare sinapse. Etapele transmiterii, așa cum au fost observate la nivelul acestei structuri, sînt în linii mari extrapolate și pentru restul sinapselor centrale și periferice. Diferențele inerente pînă în prezent nu par totuși a fi de ordin fundamental. Rezumînd aceste date se poate afirma că transmiterea sinaptică este constituită dintr-o secvență de evenimente a căror desfășurare ar fi următoarea:

1.4.2.1. *Sinteza mediatorului*

Sinteza mediatorului, procesul biochimic de sinteză a substanței mediatoare cu toate particularitățile specifice, are loc atît la nivelul somei neuronale cît și la nivelul terminației nervoase. Ambele zone de sinteză sînt prevăzute cu echipamentul enzimatic necesar. Mediatorul chimic produs la distanță, în corpul neuronal, este transportat pînă la nivelul terminației prin fluxul axonal descendent menționat anterior.

1.4.2.2. *Stocarea mediatorului*

Stocarea mediatorului este procesul prin care se creează rezervele presinaptice de substanță necesare pentru momentul în care trenul de stimuli presinaptici va determina eliberarea într-un ritm mult mai mare decît cel de sinteză. Sediul stocării este astăzi mult controversat. Pînă nu de mult se considera că veziculele sinaptice ar reprezenta sediul unic al stocurilor presinaptice de mediator. Excesul de mediator ce nu a putut fi stocat în vezicule se consideră că ar fi hidrolizat de enzimele specifice din citoplasmă (acetilcolinesteraza — AChE — pentru acetilcolină, carboximetiltransferaza — COMT — și monoaminoxidaza-MAO — pentru catecolamine). Cercetări recente pe sinapsa gigantă din organul electric al unor pești au dus la găsirea unor stocuri citoplasmatice de mediator. Se descrie un compartiment stabil

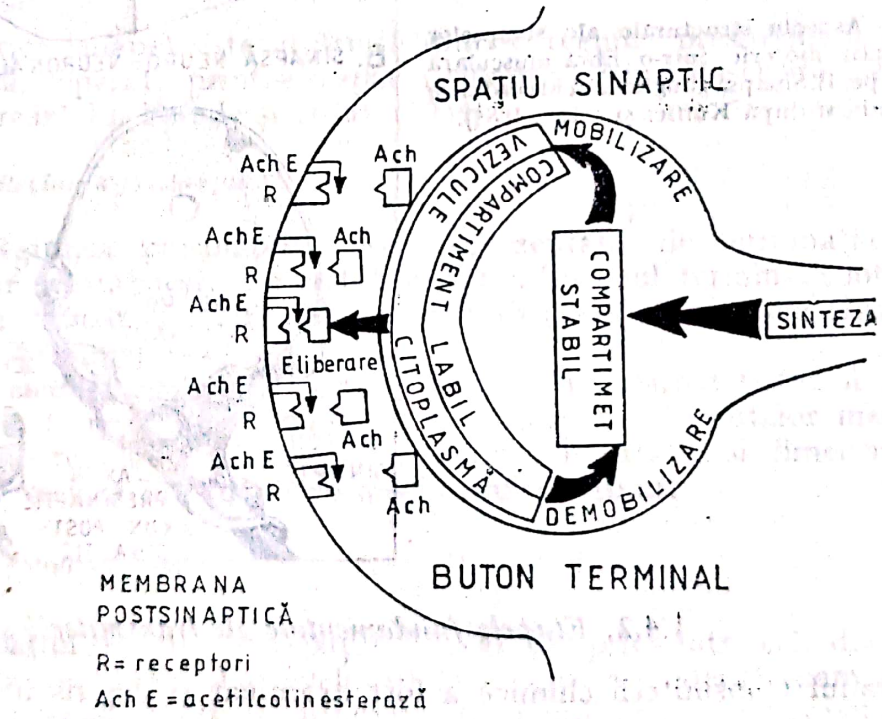


Fig. VIII. 7 — Reprezentarea schematică a etapelor transmiterii sinaptice.

(de „depozit") care cuprinde mediatorul de rezervă ce se eliberează mai tîrziu în cursul stimulării. Al doilea compartiment ar fi reprezentat de compartimentul labil, conținînd mediatorul imediat disponibil în momentul stimulării (fig. 7).

Scanned with OKEN Scanner

1.4.2.3. *Eliberaca mediatorului*

Eliberarea mediatorului este procesul prin care substanța chimică mediatoare ajunge în spațiul sinaptic. Acest proces este asimilat adesea cu un fenomen de neurosecreție explozivă declanșat de apariția potențialului de acțiune la nivelul membranei. Depolarizarea membranei butonului terminal determină, în afara pătrunderii Na^+ și un influx masiv de Ca^{2+}. Ionii de calciu din mediul extracelular pătrund în oarecare măsură prin canalele de Na^+ voltaj-dependente deschise de potențialul de acțiune. Majoritatea calciului pătrunde însă prin canale specifice de Ca^{+2} voltaj-dependente care se deschid cu o oarecare latență.

Acest influx de Ca^{2+} ar reprezenta mecanismul de cuplare a potențialului de acțiune cu secreția mediatorului (Douglas și Poisner, 1962). Ionii de calciu liberi din citoplasmă ar determina eliberarea mediatorului din depozitele imediat disponibile. La nivelul membranei veziculare, ionul ar determina modificări de conformație, echivalînd cu adeziunea veziculei de zona de eliberare, ruperea membranei și contracție urmate de expulzia conținutului în spațiul sinaptic După golirea conținutului vezicular prin exocitoză, membrana acesteia ar fi incorporată în structura membranei presinaptice, din care ulterior s-ar forma noi vezicule care se încarcă cu mediator.

Conform teoriei cuantale (Katz, Miledi, 1954), eliberarea mediatorului s-ar realiza în pachete moleculare egale între ele, numite cuante. În repaus cuantele se eliberează una cîte una, cu frecvență scăzută. În momentul apariției potențialului de acțiune în teritoriul presinaptic, frecvența de descărcare a cuantelor de mediator crește atît de mult încît, prin sumare, ele determină apariția potențialelor postsinaptice ce se pot propaga. O singură descărcare va conține în condiții normale peste 150 cuante eliberate simultan.

1.4.2.4. *Traversarea spațiului sinaptic*

Cuantele de mediator eliberate în spațiul sinaptic îl traversează prin mișcarea browniană tinzînd să ajungă la membrana postsinaptică.

1.4.2.5. *Acțiunea postsinaptică a mediatorului*

Ajuns la nivelul membranei postsinaptice, mediatorul își exercită acțiunea prin cuplarea cu receptorii specifici. Acești receptori, incluși în structura membranei postsinaptice, reprezentînd molecule a căror conformație stereochimică le permite să intre în interacțiune specifică cu molecula de mediator. Apariția complexului mediator-receptor determină modificări în structura membranei postsinaptice. Aceste transformări reversibile au drept consecință modificările de permeabilitate ce stau la baza răspunsului postsinaptic.

1.4.2.6. *Inactivarea mediatorului*

Inactivarea mediatorului este procesul prin care se realizează scoaterea din circulație a mediatorului eliberat, în vederea reluării ciclului la stimulul

următor. Viteza deosebit de mare cu care se realizează acest proces presupune existența unor mecanisme multiple. Acestea sînt:

a) *Inactivarea postsinaptică:* realizată cu ajutorul enzimelor hidrolizante din membrana postsinaptică. Aceste enzime, plasate frecvent în imediata apropiere a receptorilor, desfac complexul mediator-receptor pe măsură ce acesta se formează.

b) *Captarea postsinaptică:* o parte din mediatorul ce nu a fost fixat pe receptori este captat de structura postsinaptică și trecut în citoplasma acesteia unde este inactivat.

c) *Difuzia extrasinaptică:* o parte din mediatorul eliberat difuzează în spațiul extracelular, unde este inactivat de enzimele hidrolizante cu sediu extracelular sau captat de celulele extrasinaptice (nevroglii, celule musculare, celule sanguine etc.)

d) *Recaptare:* elementul nervos presinaptic captează o parte din mediatorul eliberat în vederea reutilizării sale.

2. MECANISME MEMBRANARE IN PATOLOGIA NEUROMUSCULARĂ

2.1. Miasteniile

Caracterizate printr-o reducere cronică a forței musculare și/ sau oboseală musculară nejustificată, miasteniile sînt rezultatul unor defecte ale transmiterii neuromusculare la nivelul plăcii motorii. Blocajul pre- sau postsinaptic, însoțit de manifestări miasteniforme, poate fi declanșat de diferiți factori cu impact invariabil membranar. În funcție de natura acestor mecanisme patogenetice, dealtfel destul de puțin cunoscute, se descrie un număr considerabil de boli, sindroame sau manifestări miastenice.

2.1.1. *Miastenia gravis*

Descrisă inițial de Thomas Willis în 1672 (cit. 134), *miastenia gravis*, deși bine studiată și cunoscută din punct de vedere clinic, a rămas pînă relativ recent o entitate patogenetică nerezolvată (134, 137, 54).

2.1.1.1. Aspecte clinice

Tabloul simptomatic complet ale bolii este cunoscut încă de la începutul secolului (65,25). Incidența variază între 4 și 6 la 100.000 (122). Boala nu afectează decît sistemul motor, lăsînd intacte sensibilitatea, reflexele, coordonarea și alte funcții nervoase. Scăderea forței și fatigabilitatea pot apare la mușchi și grupe musculare cu o extindere și evoluție diferite în funcție de forma clinică a bolii. Una dintre clasificările mult utilizate și ilustrative pentru diversitatea clinică a miasteniei grave este cea introdusă de Osserman (103, 164, 165) (tabel III).

Scanned with OKEN Scanner

TABEL III

Clasificarea clinică a miasteniei grave la adulți

Grup I, oculară Interesarea unui singur grup muscular mai ales ocular (ptoză palpebrală și diplopie); foarte ușoară; mortalitate: 0.
Grup II A, ușoară generalizată Debut gradat; frecvent începe cu simptome oculare, la care se adaugă treptat noi atingeri pînă la interesarea generalizată a musculaturii scheletice; sistemul respirator nu este interesat; mortalitate foarte redusă.
Grup II B, moderată generalizată Debut gradat; atingere oculară cu interesare moderat severă a musculaturii scheletice; sistemul respirator nu este interesat; mortalitate redusă.
Grup III, acută fulminantă Debut rapid cu scădere accentuată a forței mușchilor scheletici; interesare precoce a respirației; evoluție foarte severă; mortalitate ridicată.
Grup IV, tardivă severă Exacerbarea bolii la pacienți din grupa I și II la aproximativ 2 ani după debut; simptome și evoluție similare cu cele din grupa III.

2.1.1.2. *Patogenie*

a) Sediul mecanismului patogenetic

Joncțiunea neuromusculară a fost implicată în mecanismul patogenetic al miasteniei grave încă din 1901, cînd Oppenheim (cit. 54) a observat similitudinea bolii cu manifestările intoxicației cu curara. Trei decenii mai tîrziu această presupunere a fost confirmată de ameliorările obținute prin terapia cu anticolinesterazice (187, 232). Cercetări fiziologice ulterioare au demonstrat în mod repetat existența unei anomalii a transmiterii sinaptice neuromusculare. S-a observat de exemplu apariția răspunsului decremential la stimularea repetitivă a mușchilor interesați (98). Acest tip de răspuns a fost utilizat în diagnosticul electromiografic al miasteniei grave. Stimularea supramaximală cu frecvențe de 3—30/sec determină o depresie gradată cu peste 10% a potențialelor musculare evocate (de la al doilea la al șaselea cel puțin). Răspunsuri similare nu apar în afara miasteniei grave decît la pacienți cu afectarea neuronului motor medular, poliomielită, scleroză laterală amiotrofică (103). În cazurile în care acest test EMG este negativ, se utilizează testul epuizării postactivare (103). La 15 secunde după o faradizare de scurtă durată (50/sec timp de 10 secunde) se aplică un tren de 15—20 stimuli (3/sec), care se repetă la intervale de 1 minut timp de 10 minute. În cazul miasteniei grave apar cel puțin 2 scăderi consecutive ale amplitudinii potențialelor musculare cu mai mult de 10% (53,103) (fig. 8). În cazurile în care testele EMG de stimulare supramaximală sînt normale, se realizează testul cu curara. Pe membrul superior testat se aplică un manșon pneumatic în care presiunea se ridică la 250 mm Hg. Se injectează apoi rapid 0.2 mg dTc în 20 ml ser fiziologic. Compresia se menține timp de 6,5 minute. Se aplică la 5 și la 6 minute după injectare cîte un tren de stimuli (3/sec, 15 sec). După scoaterea manșonului (la 1,5 minute) se aplică la fiecare minut cîte un tren de stimuli (3,5,10 15 sau 20/sec timp de 15 secunde) timp de 11—12 minute. Dacă apare un decrement mai mare de 10%, procedura se continuă pînă la revenire (40—45 minute). Testarea poate fi considerată completă dacă, la cei cu răspuns anormal la

Scanned with OKEN Scanner

testul regional cu curara, se administrează i.v. 10 mg edrophoniu care normalizează răspunsul (103) (fig. 9).

Studiile plăcii motorii cu microelectrozi la pacienți cu miastenie au scos în evidență faptul că amplitudinea potențialelor miniaturale de placă motorie (mepps) au o amplitudine cu circa 20% redusă față de normal (60). Această reducere a amplitudinii mepps a fost inițial considerată a reprezenta o reducere a conținutului în acetilcolină a cuantelor de mediator. Ipoteza unui defect

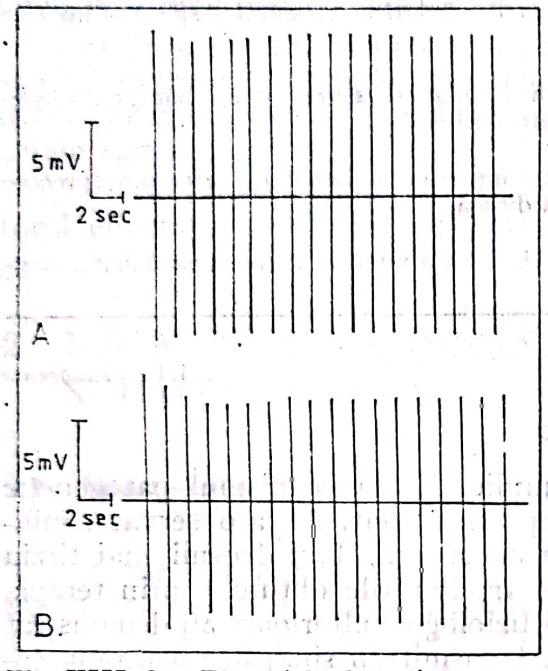


Fig. VIII. 8 — Potențiale de acțiune evocate prin stimulare repetitivă a nervului median stîng la o pacientă cu miastenie. Potențialele înregistrate la frecvența de 3/sec înainte (a) și la 6 minute după o scurtă faradizare (50/sec, 10 secunde). (După Horowitz, 1976).

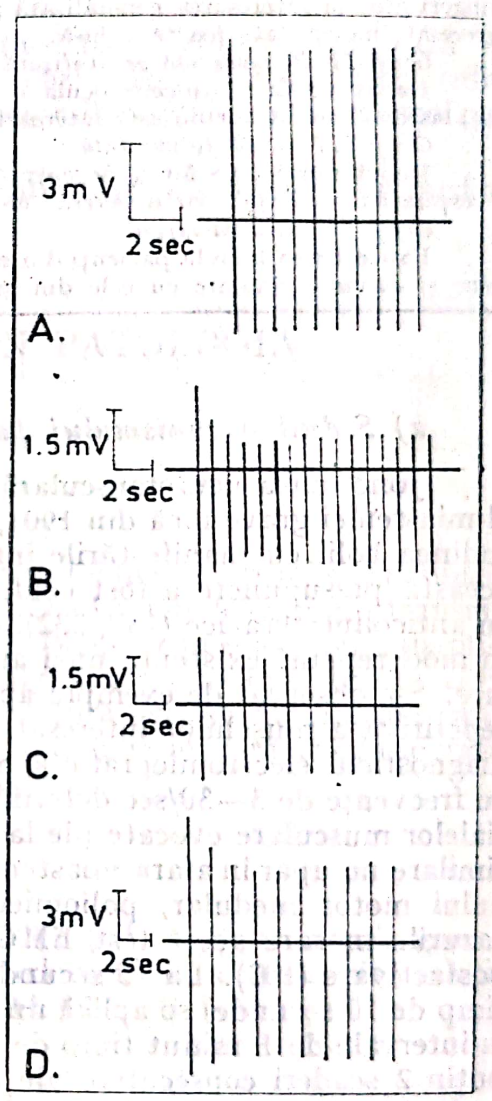


Fig. VIII. 9 — Potențiale de acțiune evocate prin stimulare repetitivă supramaximală (5/sec) a nervului median stîng la o pacientă cu miastenie înainte (A) și la 8,5 minute după administrare de dTc (B). La 12 minute după aplicarea de dTc și 2 minute după aplicarea de edrophoniu reacția miastenică se ameliorează (C) pentru a reapare la 60 minute după dTc și 50 minute după edrophoniu (D).

presinaptic al eliberării de acetilcolină putea fi convenabil utilizată în explicarea fenomenelor clinice și observațiilor electromiografice. Cum, pînă în ultimul deceniu nu a existat nici o alternativă viabilă, numeroși autori au considerat mecanismul ca fiind plauzibil în patogenia miasteniei grave (152). Trebuie totuși menționat că numeroase studii fiziologice, farmacologice și morfologice întreprinse nu au reușit să identifice sediul presupusului defect presinaptic (cit. 134).

Pe baze teoretice, amplitudinea redusă a MEPPS putea fi explicată și prin scăderea numărului de receptori colinergici la nivelul membranei post-

Scanned with OKEN Scanner

sinaptice. O suspiciune în acest sens a fost manifestată pentru prima oară de Simpson încă din 1960 (209). Abia descoperirea neurotoxinelor din veninul de elapide, capabile să se fixeze specific pe proteine receptorului colinergic (129), a permis localizarea la nivel postsinaptic a leziunii specifice responsabile de apariția miasteniei grave. S-a utilizat alfa-bungarotoxina (alfa-BuTx) marcată cu ^{125}iod, capabilă să se fixeze practic ireversibil pe receptorii colinergici. Utilizînd această tehnică, în 1973 s-a demonstrat faptul că joncțiunea neuromusculară a pacienților miastenici captează doar 11—30% din cantitatea de iod marcat fixată de mușchiul normal (67). Scăderea numărului de receptori colinergici la persoane cu miastenie gravă a fost confirmată de numeroase studii ulterioare (tab. IV)

TABEL IV

Scăderea numărului de receptori colinergici (AchR) la pacienți cu miastenie gravă (MG)

Metodă		Rezultate		Referință
		Normal	M.c.	
Legarea ^{125}I—BuTx de joncțiunea neuromusculară (J.N-M)	Scintilație	3,7 × 10^7 Ach R/	0,54 × 10^7 Ach R/ J.N.M.	50
	Autoradiografie	3,75/2 U. arbitrare	1,54/4 U. arbitrare	50
Legarea ^{125}I—BuTx de J.N-M.	Numărare gamma	1,54 × 10^7 AchR/ J+N-M.	0,49 × 10^7/ J.N-M	51
Peroxidază BuTS	Microscopie electronică	Supraf. AchR/ Supraf. membranei presinaptice 3,06	0,98	52
Legarea ^{125}I—BuTx	Numărare gamma	28,6 × 10^{-14} M AchR/g. mușchi	10,3 × 10^{-14} M AchR/g. mușchi	53
Iontoforeză cu Ach	Sensibilitatea la Ach	2302 mV/nC	675 mV/nC	54

De altfel determinarea radiometrică a AchR în biopsiile musculare pare a fi unul dintre cele mai sensibile teste de diagnostic al miasteniei grave (cit. 54).

În aceste condiții s-a pus problema dacă reducerea AchR este responsabilă *per se* de tulburările clinice și fiziologice din miastenia gravis și nu doar o consecință paralelă a unui alt defect. Răspunsul s-a obținut printr-un model experimental de blocaj experimental selectiv al receptorilor cu alfa-cobratoxină la șobolani. Animalele au dezvoltat caracteristicile tipice miasteniei grave umane (202.) În același model, amplitudinea mepps este de asemenea redusă (30). De altfel și datele morfopatologice obținute în joncțiuni neuromusculare la pacienți cu *miastenia gravis* sînt favorabile unei atingeri cu localizare prioritar postsinaptică. Pliurile membranei postsinaptice tind să se șteargă tinzînd să-și simplifice evident geometria, în timp ce terminațiile presinaptice, deși sînt adesea alungite și subțiate, prezintă numărul obișniuit de vezicule sinaptice structural intacte (59, 181, 182). Nu s-au putut observa anomalii funcționale, care să nu fie determinate de reducerea numă-

Scanned with OKEN Scanner

rului de receptori colinergici. Eliberarea acetilcolinei în condiții de repaus nu diferă la mușchi miastenici față de normal (119), iar depolarizarea prin potasiu determină eliberări de acetilcolină mai mari decît la normal (157). Concentrația de acetilcolină în mușchii intercostali miastenici este crescută (157). Conținutul cuantal al descărcărilor evocate electric este normal (60, 139), sau chiar crescut (46). Receptorii rămași în plăcile motorii miastenice par a fi normali din punct de vedere funcțional (flux ionic, durata deschiderii) (45).

Deși constituie argumente convingătoare în favoarea implicării AchR postsinaptice în patogenia miastenici grave, rezultatele mai sus prezentate nu clarifică mecanismul leziunii membranare semnalate. În cele ce urmează, după o scurtă prezentare a receptorilor colinergici, vor fi reunite datele referitoare la acest mecanism.

b) *Receptorul colinergic*

Receptorul colinergic nicotinic (AchR) este primul receptor neurotransmițător care a putut fi identificat ca entitate moleculară, izolat și purificat într-o formă activă și, în fine, reconstituit în membrane artificiale cu păstrarea cantitativă a proprietăților funcționale (39, 134, 137). AchR sînt proteine membranare integrale localizate la vîrful pliurilor membranei postsinaptice a fibrelor musculare scheletice (68). La acest nivel receptorii sînt plasați în contiguitate. Pentru o joncțiune există doar aproximativ 1×10^7 receptori, ceea ce revine la aproximativ 40 micrograme receptor/kg mușchi (67, 134, 139). Acești receptori leagă acetilcolina eliberată din terminația presinaptică des-

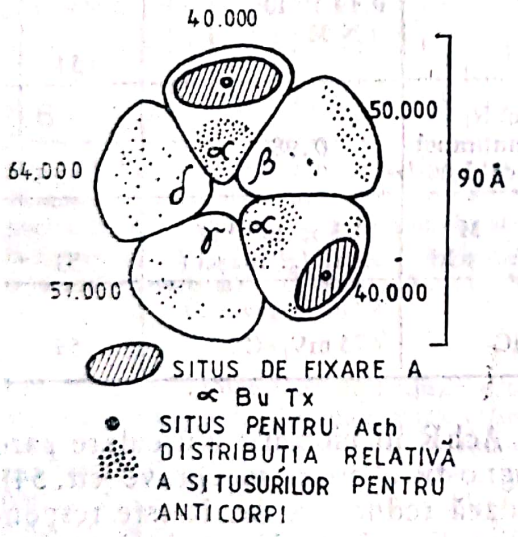


Fig. VIII. 10 — Subunitățile AchR văzute de pe fața externă a membranei (reprezentare schematică) (modificat după A. Vincent, 1983).

chizînd tranzitoriu un canal cationic specific. Rezultă o depolarizare locală care poate declanșa un potențial de acțiune determinînd contracția musculară. Pentru activarea canalului este necesară legarea simultană pe receptor a două molecule de acetilcolină. Trecînd în stare deschisă, canalul permite timp de o milisecundă un flux pasiv de circa 50.000 cationi monovalenți (210). Activarea receptorului se oprește atît prin difuzia acetilcolinei cît și prin distrugerea sa de către acetilcolinesterază, situată în lamina bazală dintre terminația nervoasă și membrana postsinaptică (190).

Structura moleculară a receptorilor colinergici din organele electrice ale unor pești, cum ar fi *Torpedo californica* sau *Electrophorus electricus* este cunoscută în detaliu. Din aceste structuri pot fi izolate și purificate mari canti-

tăți de proteină receptoare. Receptorul colinergic de Torpedo este format din 4 subunități: două subunități alfa (p.m. 50116), o subunitate beta (p.m. 53.618), o subunitate gamma (p.m. 56.279) și una delta (p.m. 57.567) formînd un complex cu p.m. 267.757 (40, 134, 162). (Fig. 10). În mod normal acești receptori există în formă dimerică apărută printr-o legătură disulfidică formată între subunitățile delta (31). Structura receptorilor din mușchiul scheletic de vertebrate pare a fi similară. Există de exemplu o omologie de secvență de 80% între subunitatea alfa de Torpedo și cea umană (105). Toate subunitățile prezintă întinse omologii de secvență, presupunîndu-se că ar apărea prin duplicarea genelor avînd o structură fundamental omologă (40, 162). În ciuda acestor similitudini majoritatea anticorpilor antisubunități (dar nu toți) sînt specifici subunității în cauză (88, 223, 224). Toate subunitățile sînt glicozilate (39, 6), iar subunitățile alfa și beta conțin lipide legate covalent (39, 134, 136). Extremitățile N-terminale ale subunităților sînt plasate pe suprafața extracelulară, în timp ce extremitățile C-terminale se află pe suprafața citoplasmatică a membranei postsinaptice (6). Unele subunități sînt fosforilate sub acțiunea unor proteinchinaze membranare atașate (39, 79, 174). Majoritatea receptorului este expus spre suprafața extracelulară și se presupune că există 5 domenii de alfa helix transmembranar în fiecare subunitate (69, 92, 114, 134). Extremitatea aplicală a receptorului protrude în spațiul sinaptic cu 55—70 Å pentru o lungime totală (normală la planul membranei) de 110 Å. Protruzia de pe fața internă este de numai 10—15 Å. Forma sa este probabil cilindrică. Pe fața sinaptică subunitățile apar compactate, formînd o structură în rozetă cu diametrul de circa 90 Å și o adîncitură centrală de 15—20 Å (39). Subunitățile alfa formează zonele de fixare a acetilcolinei (114). Nu s-a putut atribui vreun rol specific celorlalte subunități (29, 134). Canalul cationic pare a traversa membrana prin centrul receptorului, iar subunitățile par a fi orientate în jurul său. Fiecare subunitate donează un domeniu pentru a forma canalul la fel ca doagele unui butoi (69, 134).

S-au descris mecanisme complexe de reglare metabolică a receptorilor colinergici musculari (66). În culturi celulare receptorii colinergici sînt sintetizați (probabil în reticulul endoplasmic rugos) și asamblați pînă la punctul în care pot fixa ^{125}I-BuTx în mai puțin de 15 minute. Completarea asamblării necesită procese de glicozilare. Receptorii funcționali apar pentru prima dată în aparatul Golgi cu zonele ligand-specifice orientate spre interiorul unor vezicule membranare închise. Încorporarea acestor receptori în plasmalemă se realizează în aproximativ 2—4 ore (137). Dacă în mușchiul adult normal AchR sînt concentrați în membrana postsinaptică (56), în mușchiul denervat sau înaintea inervării receptorii se răspîndesc aproape uniform pe întreaga suprafață a fibrei. Acești receptori „extrajoncționali" sînt de 10 ori mai numeroși decît cei „joncționali" ai fibrei inervate. Rata de *turnover* a receptorilor „extrajoncționali" este de 10 ori mai rapidă (t 1/2 20 h față de 5—7 zile), durata deschiderii canalului ionic este mai mare. Diferențe mari apar în ceea ce privește punctele izoelectrice, proprietățile farmacologice și fixarea anticorpilor pentru receptorii „joncționali" ai plăcilor motorii adulte. (41, 44, 97, 178). Este posibil ca de fapt aceste diferențe să nu reflecte existența a 2 tipuri de receptori, ci existența unor procese posttranslaționale înafara celor de glicozilare și fosforilare (97, 198), precum și modificări ale asocierii cu lipidele

Scanned with OKEN Scanner

membranare, cu componente ale laminei bazale la nivelul extremității extracelulare a receptorului sau cu componente specifice ale citoscheletului de pe suprafața citoplasmatică a receptorului, cum ar fi proteina subsinaptică de 43 kd (ce se asociază cu subunitatea beta a receptorului) (89, 198). Ciclul biochimic parcurs de AchR se termină cu „internalizarea" lor prin procese de endocitoză, continuate cu formarea unor lizozomi secundari în care se desfășoară liza enzimatică a proteinei receptoare (54, 137).

c) *Miastenia gravis autoimună experimentală* (MGAE)

Posibilitatea ca miastenia gravis să fie un proces autoimun a fost suspectată inițial pe baza unor dovezi indirecte, cum ar fi frecvența mare a asocierilor cu anomalii timice (28), asocierea cu alte boli presupuse autoimune (181, 182, 209), scăderea nivelului complementului seric (cit. 54). În același sens pledau și datele privind apariția la unii pacienți miastenici a unor anticorpi antimușchi (reticul sarcoplasmic) capabili să reacționeze încrucișat și cu celulele mioide timice (cit. 54), dar a căror participare la patogenia miasteniei grave nu a putut fi demonstrată.

Cu toate că aceste dovezi circumstanțiale sugerau posibilitatea unei anomalii a sistemului imunitar, realitatea existenței unui atac autoimun nu a putut fi probată decît abia după ce purificarea AchR a devenit posibilă. Încercînd să obțină anticorpi specifici, Patrick și Lindstrom (1973) (167), au injectat la iepuri AchR purificați din placa electrică de Torpedo, reproducînd principalele caracteristici ale miasteniei grave umane: scăderea forței musculare, insuficiență respiratorie, răspuns decremential la stimulare nervoasă repetitivă, ameliorări după tratament cu anticolinesterazice. Efectele imunizării la AchR au fost studiate și reproduse la numeroase specii începînd cu batracienele (160) și terminînd cu primatele (55). În toate cazurile s-a obținut același tablou simptomatic de miastenie gravă autoimună experimentală (MGAE), considerat a fi cel mai relevant model animal al miasteniei grave umane (134, 137).

Șobolanii Lewis, imunizați cu proteine AchR în adjuvant Freund complet, dezvoltă la 8—10 zile o formă acută de MGAE, Dacă această formă nu este suficient de gravă pentru a fi letală — animalele redevin aparent normale în 2—3 zile. Această fază acută se caracterizează printr-o invazie fagocitică masivă a plăcilor motorii. Titrul anticorpilor anti-AchR este scăzut, se produc distrugeri largi ale membranei postsinaptice și scăderi drastice ale AchR musculari. Se produce o denervare funcțională, la care mușchiul răspunde accelerînd sinteza de AchR extrajuncționali. După cîteva zile conținutul în AchR și transmiterea revin la normal. Atacul fagocitar se datorează mai ales utilizării intensive de adjuvanți (Freund și vaccin pertussian) dar, în forme atenuate, apare și în absența acestora. Reacția acută fagocitară apare și în cazul în care se injectează anticorpi anti-AchR la șobolani normali. Depleția componentei C_3 a sistemului complement împiedică în acest caz invazia fagocitară. Este de presupus prin urmare că în cazul MGAE atacul fagocitic este declanșat atît de fixarea anticorpilor pe AchR musculari cît și de fixarea complementului. Fagocitele sînt probabil imunizate pasiv și, pentru a ataca membrana postsinaptică, trebuie să detecteze simultan atît anticorpii cît și factorul C_3 fixați. Efectul direct al anticorpilor asupra AchR din joncțiunea neuromusculară normală nu pare a fi important. Transmiterea se menține normală chiar dacă 67% dintre receptori sînt cuplați cu anticorpii specifici. În cazul animalelor cu forme cronice de MGAE la care, prin dimi-

Scanned with OKEN Scanner

nuarea densității receptorilor, factorul de siguranță al transmiterii (nr. receptori/nr. molecule de Ach eliberate) este mult scăzut, administrarea de anticorpi compromite transmiterea într-o măsură mult mai mare (15, 134, 137).

Forma cronică a MGAE este mult mai relevantă pentru miastenia gravă umană. Numărul de receptori se reduce la circa 30% din normal, factorul de siguranță al transmiterii este scăzut, nu mai apare invazia fagocitică, structura în pliuri a membranei postsinaptice este mult simplificată, majoritatea receptorilor rămași sînt legați de anticorpi, iar complementul este fixat pe membrana postsinaptică.

d) *Anticorpii anti-AchR*

Dovezile privind scăderea numărului AchR în miastenia gravă precum și datele obținute în MGAE au determinat căutarea intensivă a anticorpilor anti-AchR circulanți la pacienții cu miastenie gravă. Acești anticorpi au fost identificați prin diferite metode bazate pe utilizarea alfa-BuTx pentru testarea specificității (5, 35, 54, 111, 134). Cercetări cu anticorpi monoclonali au evidențiat faptul că în MGAE majoritatea anticorpilor și cei mai „miastenigeni" sînt cei dirijați spre suprafața externă a AchR. Regiunea imunogenă principală pare a fi cea situată în secvența primară a subunității alfa (87, 134, 136, 223, 224). Ceilalți anticorpi ar putea fi helperi sau supresori ai MGAE (134) în timp ce anticorpii dirijați spre extremitatea internă a AchR nu intervin în miastenie (201). Anticorpii monoclonali pentru situsul de recunoaștere a acetilcolinei sînt deosebit de eficienți în a bloca acut transmiterea neuromusculară (78).

Anticorpii antireceptor ai pacienților cu miastenie gravă au fost studiați utilizînd variații anticorpi monoclonali ca inhibitori competitivi (224). Spectrul mediu al specificităților anticorpilor pare a fi același la toate grupurile de pacienți și similar cu cel obținut la animale cu MGAE. Răspunsul imunitar este policlonal și rămîne constant în timp, indiferent de starea clinică și titrul anticorpilor (224). S-a semnalat în literatură un singur caz cu răspuns monoclonal (97).

e) *Mecanismul de acțiune al anticorpilor miastenici asupra receptorilor la acetilcolină*

Imunoglobulinele de la pacienți miastenici pot reduce numărul de AchR prin mai multe mecanisme posibile:

— Alterarea *turnover*-ului AchR fie prin accelerarea degradării, fie prin reducerea sintezei;

— Blocarea zonei active a receptorului;

— Lezarea AchR în asociație cu sistemul complement și/sau cu elemente celulare.

Datele obținute pînă în prezent sugerează intervenția unei degradări accelerate, a blocajului și a lezării receptorilor fără a se putea preciza participarea relativă a celor trei mecanisme (134, 138, 136).

— *Degradarea accelerată a AchR.* Pe culturi de mușchi scheletic de șobolan tratate cu IgG de la pacienți miastenici, tata de degradare a AchR crește de la valoarea normală de 4%/h la valori de 8—12 %/h (7,54). Fenomenul nu necesită prezența altor componente imunitare, nu este modificat prin adăugarea factorului complement, este dependent de temperatură și poate fi parțial inhibat cu dinitrofenol. Rezultate asemănătoare s-au obținut

Scanned with OKEN Scanner

și cu anticorpi de la animale cu MGAE (226). IgC miastenică nu accelerează degradarea AchR în general, ci doar a celor pe care se fixează (55). Accelerarea degradării este condiționată de o prealabilă asociere a AchR prin legarea lor simultană de cele 2 brațe ale moleculei în Y a IgG (fig. 11). Anticorpii divalenți $F(ab')_2$ purificați din IgG miastenică păstrează capacitatea de a accelera

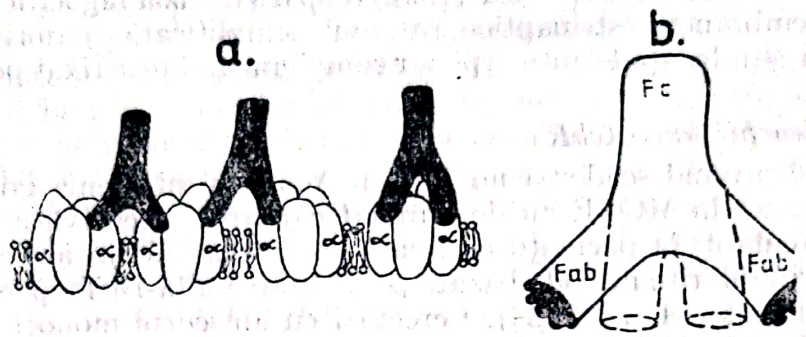


Fig. VIII. 11 — a. Legarea inter—și intramoleculară a anticorpilor miastenici pe subunitățile alfa. Legarea intermoleculară accelerează degradarea. b. Reprezentare schematică a unei molecule de IgG evidențiind flexibilitatea zonelor de fixare, determinată probabil de numărul legăturilor disulfidice dintre lanțurile grele (modificat după A. Vincent; 1983).

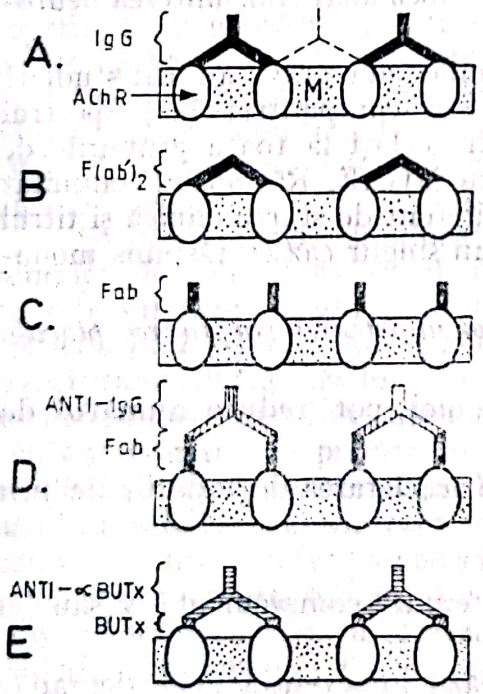


Fig. VIII. 12 — Reprezentare schematică a legării receptorilor colinergici prin fragmente diferite de anticorpi (M: membrana musculară; AchR: receptor colinergic). Accelerarea degradării s-a observat în situațiile experimentale A, B, D, E. Fragmentul Fab singur nu a accelerat degradarea (modificat după Deschman, 1981).

degradarea AchR, în timp ce forma monovalentă Fab își pierde această capacitate (fig. 12) (54, 138, 177). Asocierea receptorilor în prezența IgG miastenice a putut fi observată cu metode autoradiografice, de microscopie cu fluorescență și mai ales prin microscopie electronică cu criodecapaj (37,54). La circa 1 oră de contact cu IgG, particulele intramembranare de AchR se aglomerează în grupuri compacte de pînă la 60 particule. Distanța dintre particule este consistentă cu perimetrul unei molecule de IgG. Aglomeratele tind să se apropie între ele și apar depresiuni de 100 nm diametru, reprezentînd

probabil veziculele căptușite ce asigură endocitoza. Agregatele dispar în cîteva ore. AchR trecuți astfel în citoplasmă sînt degradați de enzimele lizozomale (36). Aceeași secvență apare nu numai în culturi ci și în joncțiunile neuromusculare intacte (54).

— *Sinteza și încorporarea AchR* nu sînt diminuate în prezența IgG miastenice. Există date care par să indice existența unei creșteri compensatoare a acestor procese (54).

— *Blocarea AchR.* Cel puțin la o parte dintre pacienții miastenici există anticorpi capabili să blocheze AchR, contribuind astfel la simptomatologia specifică. Serul de la unii miastenici interferează cu legarea alfa-BuTx în 7—68% din cazuri (5,58). Administrate *in vitro* sau *in vivo* unele seruri determină blocaje de tip funcțional ale transmiterii neuromusculare (101,207). Plasmafereza determină uneori în cîteva ore-zile o ameliorare rapidă a simptomatologiei clinice (cit. 54). Serul imun miastenic conține și numeroși anticorpi care se leagă de AchR în alte zone decît cea activă, contribuind la patogenia miasteniei grave prin alte mecanisme decît cel de blocaj (54). Date recente au pus în evidență faptul că proprietățile funcționale ale AchR în culturi de mușchi uman cu miastenie nu sînt modificate față de mușchiul normal (43, 44, 3).

— *Lezarea structurală a AchR.* Studiile microscopice și electronmicroscopice au evidențiat la miastenici o serie de anomalii morfologice ale joncțiunii neuromusculare (a se vedea mai sus). Anticorpii miastenici ar putea produce fragmentarea și descuamarea membranei postsinaptice în spațul sinaptic (63). Aceste procese par a fi condiționate de intervenția primilor factori ai sistemului complement (mai ales C_3). În exacerbările clinice nivelurile complementului circulant sînt scăzute, iar factorii C_3 și C_9 au fost găsiți în plăcile motorii lezate (63). Factorii complement nu participă la accelerarea degradării și nici la blocarea receptorilor. Este posibil ca, împreună cu IgG miastenică, să determine lezarea membranei postsinaptice.

f) *Patogenia miasteniei grave*

Așa cum apare astăzi, patogenia miasteniei grave este un proces deosebit de complex. Există probabil un număr de evenimente declanșatoare, care determină un răspuns autoimun la receptorii colinergici (186). Acest răspuns autoimun, la rîndul său, afectează transmiterea neuromusculară prin mai multe mecanisme. Mai mult, evenimentele inițiatoare, cele imunoreglatoare, precum și efectele răspunsului imun pot fi, la rîndul lor, alterate de interacțiuni trofice, hormonale și terapeutice.

Au fost identificate mai multe grupe clinice de pacienți cu miastenie gravă care ar putea eventual reflecta modalități diferite de inducere a bolii (38). Aproximativ 10—20% dintre miastenici se caracterizează prin prezența unui timom, titruri ridicate ale anticorpilor pentru AchR, producerea de anticorpi pentru striațiile musculare și absența totală a altor autoanticorpi. Un alt grup (circa 20—30% din total) este format mai ales din femei sub 40 ani, cu concentrații intermediare de anticorpi pentru receptori, cîțiva anticorpi pentru striații, alți autoanticorpi și prezența antigenelor HLA-Al și/ sau DRW3.

Un al treilea grup (circa 30—40% din total) este format predominant din bărbați cu niveluri scăzute de anticorpi antireceptor, numeroși alți autoanticorpi și prezentînd antigene HLA-A3, B7 și/sau DR W2. Un al

Scanned with OKEN Scanner

patrulea grup, numeric redus, este constituit din pacienți cu artrită reumatoidă tratați cu D-penicilamină (228, 229). Nou-născuții din mame cu miastenie gravă formează al patrulea grup clinic. Unii dezvoltă o formă tranzitorie de miastenie gravă, datorită transferului pasiv de autoanticorpi de la mamă. Manifestările dispar odată cu îndepărtarea anticorpilor materni (134). Există și forme congenitale rare de miastenie care nu par a fi legate de defecte autoimune ale transmiterii neuromusculare (61, 227).

Deși există numeroase date care sugerează posibilități multiple de declanșare a răspunsului autoimun, nici pînă astăzi nu se poate vorbi despre certitudini în acest sens. Incidența crescută a anumitor tipuri de antigen HLA la grupuri diferențiate de pacienți sugerează existența la acești indivizi a unei deficiențe sau hiperreactivități imunitare, care ar putea fi un factor predispozant. Prezența timoamelor la unii pacienți (10%) și a hiperplaziilor timice și a centrilor germinativi la numeroși alții (72%), precum și efectele favorabile ale timectomiei, demonstrează existența unei participări semnificative a timusului. Timoamele ar putea eventual sugera existența unui virus transformant (134). Factorul imunogenic inițial pare a fi localizat în timus avînd în vedere prezența celulelor mioide, a receptorilor colinergici precum și posibilitatea dezvoltării unor celule musculare din culturile de timus (113, 236). Faptul că autoanticorpii pacienților recunosc numeroase determinante antigenice ale receptorilor, demonstrează că imunogenul inițiator este însăși AchR și nu o altă moleculă (224). În fine, faptul că anticorpii de la miastenici reacționează frecvent cu determinante antigenice caracteristice AchR extrajuncționali, pare a demonstra că imunogenul inițiator ar putea fi reprezentat de acești receptori (97). Determinarea titrului anticorpilor antireceptor din serul pacienților este considerată un mijloc extrem de util în diagnosticul miasteniei grave și aprecierea răspunsului la terapia imunosupresivă. Anticorpii pot fi determinați prin imunoprecipitare indirectă cu extracte crude de receptori din mușchi uman marcați cu concentrații subsaturante de ^{125}I-alfa BuTx. Cu această metodă pot fi detectați anticorpi la aproximativ 90% dintre pacienți (38, 112, 113). Utilizarea altor antigene, cum ar fi cele din mușchi bovin fetal sau adult denervat, scade eficacitatea metodei (80). Titrul anticorpilor variază larg de la abia detectabil (0,6 nmoli receptor legați la un litru de ser) pînă la foarte înalt (peste 1000 nmoli), cu o medie de 50 n moli. Deși titrul mediu al pacienților cu forme ușoare este mai scăzut decît la cei cu forme grave, valorile individuale nu se corelează satisfăcător cu severitatea simptomelor. Doar modificările relative ale titrului individual reflectă în oarecare măsură modificările severității îmbolnăvirii (134, 205). Această corelație redusă se datorează, probabil, spectrului larg de specificități a anticorpilor antireceptori, mecanismelor multiple prin care anticorpii afectează transmiterea neuromusculară, variabilității factorului de siguranță al transmiterii și prezenței unor mecanisme adaptative multiple de menținere a acestui factor. Un exemplu de dificultate în manipularea acestor variabile este cel al terapiei cu anticolinesterazice. Dacă doza administrată este prea mică se produce scăderea forței de contracție, iar dacă este prea mare receptorii supraactivați trec în forma desensibilizată. În ultima situație receptorii supraactivați favorizează intrarea masivă a Ca^{2+}, care determină distrugeri ale morfologiei postsinaptice (133).

Relațiile dintre limfocite și răspunsul autoimun din miastenia gravă nu au rămas în afara sferei cercetărilor de patogenie a bolii. Cultivate *in vitro*

atît limfocitele periferice cît și cele timice obținute de la pacienți s-au dovedit a produce antocorpi antireceptori (54). Limfocitele periferice de la bolnavi cu miastenie, puse în prezența receptorilor de Torpedo sînt puternic stimulate, încorporînd cantități mari de timidină (42, 158). Acest fapt reflectă, probabil, o stimulare a prolferării celulelor T-helper similare celor observate și în MGAE (50). Limfocitele timice sînt cunoscute pentru capacitatea de a mări producția de anticorpi antireceptori de către limfocitele periferice. La acest proces ar putea contribui celulele T-helper și celulele ce prezintă antigenul (134, 161). De la un pacient cu miastenie gravă s-a izolat o linie de limfocite T de lungă durată, care reacționează la AchR umani, dar și de Torpedo (95). Aceste celule au fenotipul de suprafață al celulelor T-helper și sînt genetic restrînse la HLA—DR3. Proliferarea acestor celule indusă de receptori poate fi blocată cu anticorpi monoclonali la determinantele DR.

Studiul subpopulațiilor limfocitare la pacienți cu miastenie gravă nu a dus pînă în prezent la rezultate concludente. Unele cercetări au semnalat scăderi ușoare ale limfocitelor periferice OKT3 și OKT8 pozitive și absența oricăror diferențe în ceea ce privește celulele mononucleare timice OKT_3, OKT_4, OKT_6, OKT_8-pozitive (cit. 54). Alte cercetări au evidențiat o creștere a limfocitelor supresoare (Leu-2a și OKT8 pozitive). În alte cazuri s-a observat o ușoară creștere a raportului dintre limfocitele OKT4 pozitive (helper) și OKT8 pozitive (supresoare). Nu s-au putut evidenția deocamdată corelații clinice și funcționale ale acestor modificări. În orice caz rămîne bine stabilit faptul că, în afara reacției umorale (autoanticorpi), în patogenia miasteniei grave un rol important este jucat și de imunitatea celulară, probată dealtfel atît de infiltrația limfocitară a mușchiului atins, cît și de sensibilizarea celulară la AchR (41,42).

Datele prezentate demonstrează caracterul diversificat al mecanismelor prin care este declanșat atacul autoimun antireceptor în miastenia gravă. În același sens pledează diferențele clinice și imunologice (histocompatibilitate, anticorpi, afectarea timusului etc.) dintre diferitele grupuri de pacienți (a se vedea mai sus), precum și răspunsul diferențiat la diferite tipuri de terapie.

2.1.1.3. *Aspecte terapeutice în miastenia gravis*

Tratamentul modern al miasteniei grave a îmbunătățit atît de mult evoluția clinică a bolii încît astăzi majoritatea pacienților sînt capabili să se întoarcă la o viață complet productivă. Din păcate însă nu se poate vorbi despre vindecare: majoritatea pacienților trebuie să continue medicația, care are și numeroase efecte secundare adverse. În general, astăzi se utilizează curent patru metode de tratament — metode de activare a transmiterii sinaptice; — metode imunosupresive;—timectomia chirurgicală; — depleția anticorpilor circulanți (36, 59, 137).

a) *Activarea transmiterii neuromusculare*

Scopul acestor metode terapeutice este de a crește cantitatea de acetilcolină disponibilă pentru interacțiunea cu AchR. Cel mai eficace grup de substanțe sînt derivați de amoniu cuaternar anticolinesterazici (piridostigmină, neostigmină etc.), care blochează hidroliza enzimatică a Ach eliberate. Putînd acționa în mod repetat cu AchR rămași disponibili, moleculele de acetilcolină măresc amplitudinea potențialelor locale de placă motorie. Depășin-

Scanned with OKEN Scanner

du-se pragul de excitație într-un număr mare de joncțiuni, forța musculară și răspunsul electric la stimularea repetitivă se ameliorează evident. Dozele de anticolinesterazice trebuie atent manipulate, întrucît excesul poate agrava miastenia prin depolarizare sau prin desensibilizarea AchR. Experimental s-a demonstrat că agenții anticolinesterazici în doze foarte mari pot determina manifestări miastenice prin scăderea numărului de AchR, reducere a amplitudinii potențialelor miniaturale de placă motorie și alterări ale structurii membranei postsinaptice (54).

Creșterea eliberării de acetilcolină din terminațiile nervoase poate fi determinată cu o serie de agenți utilizați uneori ca adjuvanți în terapia convențională a bolii. Din această categorie fac parte unii agenți adrenergici (efedrina), guanidina, germin-acetatul și 4-aminopiridina (cit. 54). De obicei acești agenți presinaptici nu aduc decît un beneficiu marginal în miastenie.

b) *Imunosupresia și depleția de anticorpi*

Corticosteroizii determină ameliorări clinice în 70—100% din cazuri, cu rezultate bune pînă la excelente în 63 pînă la 100% din cazuri (cit. 54). Pentru a menține aceste rezultate medicația trebuie continuată indefinit, fapt ce crește incidența reacțiilor secundare adverse (osteoporoză, cataractă, scăderea rezistenței la infecții etc.) Corticosteroizii sînt indicați în general în toate situațiile cu răspuns nesatisfăcător la anticolinesterazice și/ sau timectomie. Corticosteroizii exercită efecte supresive la diferite niveluri ale sistemului imun, reduc dimensiunile timusului și populația limfocitară. În miastenie determină reducerea nivelului anticorpilor anti-AchR și a reactivității limfocitelor periferice la AchR (54, 218).

Glucocorticoizii exercită efecte directe favorabile asupra joncțiunii neuromusculare, mărind sinteza de acetilcolină și accelerînd eliberarea cuantelor de mediator (96).

Alte imunosupresoare citotoxice (azathioprin, 6-mercaptopurine, ciclofosfamide s-au dovedit și ele active în miasteniile rezistente la corticosteroizi. Acești agenți reduc titrul anticorpilor anti-ArchR, dar începutul ameliorării clinice este lent (minimum 3 luni) (134, 137). S-a preconizat și utilizarea anticorpilor idiotip destinați zonelor de fixare a antigenului pe anticorpii anti-AchR (54). Diversitatea anticorpilor și a zonelor antigenice de pe AchR a dus la rezultate puțin încurajatoare în acest sens (54, 134).

Se fac încercări de a se realiza imunosupresie specifică, limitate deocamdată la MGAE. Utilizîndu-se un sistem murin s-au putut obține linii clonale limfocitare specifice pentru AchR atît T helper cît și T supresor. Factorul supresor specific monoclonal ar putea avea eventuale utilizări terapeutice (15). Un alt mijloc de imunosupresie specifică ar fi reprezentat de utilizarea conjugatelor AchR-toxină de ricin pentru a distruge specific limfocitele receptor-sensibile (118).

Ca mijloc de reducere a titrului autoanticorpilor circulanți se utilizează plasmafereza. Deși metoda s-a dovedit utilă în boli autoimunitare severe dar autolimitate, cum ar fi sindromul Goodpasture (144), în miastenia gravă, unde producerea de anticorpi este susținută pe perioade lungi, metoda nu este eficace în aplicări intensive. Doar în serii prelungite de plasmafereze săptămînale însoțind terapia supresivă cu corticosteroizi sau citotoxice se obțin rezultate favorabile și stabile în circa 50% din cazuri (137).

Scanned with OKEN Scanner

c) *Nimectomia*

Schumacher și Roth (1913) și Blalock și col. (1939) (cit. 54) au observat la miastenici ameliorări clinice după timectomie. Date ulterioare, obținute pe serii lungi de cazuri tratate chirurgical, au confirmat aceste rezultate. S-au obținut ameliorări în 56—86% și remisiuni în 20—36% din cazuri (115). Cea mai acceptată indicație a intervenției este în mod evident prezența timomului. La pacienții fără timom, avantajul timectomiei constă în posibilitatea unei remisiuni permanente sau a unei ameliorări importante la pacienți adulți și cu tulburări generalizate moderate sau severe.

Timectomia ar avea drept rezultat eliminarea antigenului mioid responsabil de stimularea cronică a formării de autoanticorpi. Eliminarea timusului ar putea îndepărta o importantă sursă de autoanticorpi-limfocitele timice sau, prin alte mecanisme, să corecteze perturbarea funcției imune (158). Nu este clar deocamdată care dintre aceste efecte este mai important, dar fără discuție caracteristicile individuale joacă un rol important.

2.1.2. *Miastenia tranzitorie a nou-născuților*

În această formă de miastenie, lezarea postsinaptică se datorează anticorpilor anti-AchR transferați pasiv de la mamă miastenică. Apare la 10—15% dintre copii mamelor miastenice și este spontan reversibilă în primele 3 luni de la naștere (134, 181, 182) cînd anticorpii materni dispar din circulație. Nu s-a putut găsi o corelație constantă în gravitatea îmbolnăvirii la mamă și incidența sau gravitatea simptomelor la nou-născut (181, 182)

2.1.3. *Miastenia congenitală*

Îmbolnăvire cu incidență deosebit de redusă (probabilitate de apariție sub 10^{-8}) apare în diferite forme, avînd un caracter sporadic și rareori familial. Defectul de transmitere neuromusculară nu pare a se datora unui mecanism autoimun (61, 227), deși în aceleași familii s-a observat o incidență crescută a altor defecte imune (181, 182).

2.1.4. *Sindromul miastenic indus de d-penicilamină*

Frecvența asocierii miasteniei cu poliartrita reumatismală (4%) este mai ridicată decît incidența miasteniei în populația generală (13, 14). Sindromul legat de utilizarea tratamentului cu d-penicilamină, apare la circa 4—24 luni de tratament și uneori dispare la întreruperea acestuia. Uneori terapia anticolinesterazică trebuie continuată cîteva luni. Tabloul clinic și imunitar al îmbolnăvirii produse de medicament este în totul asemănător celui din miastenia gravă. De altfel utilizarea d-penicilaminei se poate însoți și de alte îmbolnăviri disimunitare (lupus eritematos diseminat, pemphigus, anemie hemolitică și tiroidită autoimune, dermatomiozită etc.) (cit. 13).

2.1.5. *Sindromul miastenic Lambert-Eaton*

Descris în 1956 (cit. 181, 182) sindromul este o condiție miastenică rară, ale cărei caracteristici clinice și electrofiziologice sînt astăzi bine cunoscute. Boala este frecvent asociată cu un carcinom pulmonar cu celule mici

Scanned with OKEN Scanner

(134) sau de tip spinocelular (182). Scăderea forței musculare se datorează unui defect de eliberare a acetilcolinei din terminația nervoasă presinaptică. Sediul defectului este membrana presinaptică (124, 125, 156). Potențialele miniaturale determinate de exocitoza veziculelor de mediator (cuante) sînt de amplitudine normală (124), în timp ce conținutul cuantal al descărcărilor evocate prin stimulare nervoasă este scăzut (125). Spre deosebire de modificările observate în miastenia gravă, pliurile membranei postsinaptice sînt păstrate sau deseori hipertrofiate (64). Presinaptic, au fost observate demielinizări ale axonului (181, 182). Depozitele presinaptice de acetilcolină sînt normale (156), ca de altfel și răspunsul postsinaptic (124). La frecvențe joase de stimulare, manifestările EMG sînt identice cu cele din miastenie, dar la frecvențe înalte apare o potențare progresivă pînă la de 4 ori valoarea inițială a răspunsului (182). Blocul sinaptic este rezistent la anticolinesterazice dar poate fi corectat de epinefrină, metilxantine, Ca^{2+} etc. (cit. 182).

Frecventa asociere cu o tumoră pulmonară a determinat ipoteza intervenției unui factor umoral, care, produs de celulele tumorale, ar afecta membrana presinaptică (125). Această ipoteză a trebuit să fie abandonată în 1981, cînd s-a demonstrat că IgG de la pacienți cu sindrom Lambert-Eaton pot afecta transmiterea neuromusculară la șoareci (127, 128), demonstrîndu-se astfel patogenia autoimună a sindromului. Studii electronooptice, atît la pacienți cît și la animale cu transfer pasiv de sindrom Lambert-Eaton, au demonstrat scăderi evidente ale numărului de zone active de eliberare pe membrana presinaptică (73, 96). Din păcate, pînă în prezent, în cazul sindromului miastenic, spre deosebire de miastenia gravă, nu s-a realizat un model de tipul MGAE, datorită lipsei antigenului purificat corespunzător. Nu s-au putut localiza pînă astăzi anticorpii și complementul fixat presinaptic. Zonele active sînt mult mai rare față de AchR postsinaptică. S-a observat că în joncțiunile afectate numărul particulelor intramembranare mari, caracteristice zonei de eliberare, este mult redus față de normal. Aceste particule sînt considerate a reprezenta canalele de Ca^{2+} voltaj-dependente (73, 96). Ca și în *miastenia gravis*, diminuarea anticorpilor circulanți prin plasmafereză ameliorează simptomatologia (49, 118). Recent s-a realizat purificarea unui canal de Ca^{2+} voltaj-dependent din tubii în T ai mușchilor scheletici (48). Obținerea acestui antigen deschide perspectiva confirmării definitive a patogeniei autoimune a sindromului.

2.1.6. *Miastenii simptomatice*

Într-o serie de situații variate apar reacții miasteniforme, caracterizate de obicei printr-o reactivitate redusă la terapia cu anticolinesterazice. Dintre aceste circumstanțe se pot cita (181, 182):

2.1.6.1. *Denervările*

În momentele în care este redusă hiperexcitabilitatea caracteristică, mușchiul denervat se poate caracteriza din punct de vedere electrofiziologic printr-o reacție miasteniformă.

b. *Hipertiroidismul*, frecvent însoțit de reacții miasteniforme (de 30 ori mai frecvent decît populația generală), pare a acționa mai ales la nivelul mecanismului contractil prin decuplarea fosforilărilor oxidative.

Scanned with OKEN Scanner

c. *Colagenozele*, avînd probabil un factor patogenetic imunitar comun cu miastenia, se însoțesc adesea de reacții miasteniforme.

2.1.7. *Alte tulburări ale funcției sinaptice neuromusculare*

2.1.7.1. *Botulismul*

Manifestările clinice ale botulismului se datorează unui blocaj al transmiterii colinergice din placa motorie, asemănător în multe privințe celui observat în sindromul miasteniform Lambert-Eaton (94, 126, 182). *Clostridium botulinum* produce un peptid precursor cu p.m. de circa 150.000 daltoni, care ulterior se clivează, generînd două molecule de 100.000 și, respectiv, 50.000 daltoni. Se descriu 5 specii majore de *clostridium botulinum* (A, B, C, E), care produc exotoxine diferite din punct de vedere imunologic, dar fără diferențe calitative din punct de vedere farmacologic (22). Unele specii sînt mai sensibile decît altele la acțiunea unei/unor toxine. Este de subliniat faptul că în cercetarea efectelor toxinei este necesară utilizarea formei purificate. Forma așa-zis „cristalină" este un complex de neurotoxin cu hemaglutinine. Agentul toxic purificat este blocant al eliberării acetilcolinei din butonul terminal. *In vitro* determină scăderi ale frecvenței descărcării potențialelor miniaturale fără alterări ale amplitudinii acestora. După blocarea conducerii axonale, depolarizarea locală a terminației continuă să determine eliberarea cuantelor. Este de subliniat latența deosebit de mare a acțiunii toxinei, asociată cu o persistență neobișnuit de mare a acestor efecte. Avînd în vedere aceste date (22), toxina pare a-și limita acțiunea la acea etapă a transmiterii în care mediatorul traversează membrana postsinaptică. Sediul precis al acestei acțiuni nu este încă determinat, deși pare a fi în oarecare măsură calciu-dependent (126). Oprind eliberarea mediatorului toxina ar bloca totodată și eliberarea unor factori trofici sinaptici. Se ajunge astfel la un tablou general de denervare cu hipersensibilitate și uneori atrofie musculară, cînd blocul este de lungă durată (126).

2.1.7.2. *Tetanosul*

Manifestările clinice ale tetanosului sînt de sens opus celor din intoxicația botulinică și au o origine centrală. Acest fapt este explicat prin marea capacitate a toxinei tetanice de a retrodifuza prin transport axonal și transsinaptic pînă la nivelul central, unde acționează cu eficacitate mult mai mare decît la nivelul plăcilor motorii (94). Se citează totuși cazuri de paralizie periferică în tetanos asemănătoare celor din botulism. Aceste manifestări se datorează unor mecanisme asemănătoare cu cele din botulism. Acțiunile celor două toxine sînt asemănătoare, ele diferînd doar prin afinitatea mai mare pentru terminațiile colinergice periferice (toxina botulinică A), sau pentru neuronii centrali glicinergici inhibitori (toxina tetanică), precum și prin capacitatea diferită de a fi transportați retroaxonal și transsinaptic (a se vedea mai sus) (94).

2.1.7.3. *Veninuri*

Unele veninuri de șerpi sau artropode s-au dovedit a conține toxine cu punct de impact specific asupra unor componente sinaptice aparținînd joncțiunii neuromusculare. Din această categorie fac parte alfa-bungarotoxina

Scanned with OKEN Scanner

(Bungarus multicinctus) sau cobratoxina *(Naja naja)*, care blochează specific și puțin reversibil AchR plăcii motorii. Utilizate în identificarea și izolarea receptorilor colinergici, aceste toxine au fost discutate anterior *(vide supra)*. Tot din această categorie face parte și veninul de păianjen „Văduva Neagră" *(Latrodectus maetans)*, care determină o intoxicație severă, ocazional mortală, însoțită de fasciculații și fatigabilitate pînă la paralizie. Se presupune că toxina ar forma canale de calciu în membrana presinaptică inundînd axoplasma cu ioni de calciu exogeni (82, 179). În aceste condiții se produce o descărcare inițială de acetilcolină, urmată de o depleție progresivă a butonului terminal (71).

2.1.7.4. *Efectele presinaptice blocante ale unor antibiotice*

Majoritatea antibioticelor capabile să blocheze transmiterea neuromusculară intră într-una din următoarele trei categorii: *1*. Antibiotice aminoglicozidice (incluzînd streptomicina, dihidrostreptomicina, gentamicina, kanamicina neomicina); *2*. Polimixine; *3*. Tetracicline (4, 19). Acțiunea blocantă a acestor substanțe trebuie luată în considerare ori de cîte ori se utilizează în asociere cu anestezice generale, miorelaxante sau la bolnavi miastenici. *In vitro*, streptomicina, deși mărește frecvența eliberării de repaus a cuantelor de mediator, reduce semnificativ conținutul cuantal al descărcărilor evocate electric. Efectul se explică prin competiția cu ionii de calciu la nivelul zonelor active de eliberare din membrana presinaptică al căror număr scade semnificativ și reversibil (19). Acțiunea calciu-dependentă a cuantelor în interiorul terminației nervoase nu pare a fi streptomicin-sensibilă, fapt ce explică creșterea eliberării de repaus. În concentrații relativ mari (peste 1mg/ml) streptomicina determină o desensibilizare a AchR postsinaptice, care contribuie la efectul blocant și este, cel puțin în parte, tot calciu-dependentă (19).

2.1.7.5. *Efecte activatoare ale onabaïnei și ale altor glicozizi cardiaci*

În prezența ouabaïnei, eliberarea de repaus și evocată a mediatorului cresc semnificativ și greu reversibil. Acțiunea, ale cărei consecințe clinice nu sînt deocamdată evaluate, se desfășoară în două etape dintre care prima, saturabilă, pare a fi legată de blocarea transportului activ de Na^+-K^+ și acumularea de Na^+ în axoplasmă. A doua componentă, nesaturabilă, a fost pusă pe seama unei acțiuni de mobilizare a calciului din depozitele intraaxonale (17, 18).

2.1.7.6. *Acțiuni activatoare neuromusculare presinaptice prin extirparea grupărilor sialice*

Tratarea cu neuraminidază a preparatelor neuromusculare izolate *in vitro* determină creșteri semnificative calciu-dependente și greu reversibile ale eliberării cuantale a acetilcolinei în condiții de repaus și activitate. Grupările, viabil localizate în glicocalixul membranei presinaptice, reprezintă o barieră importantă de limitare a influxului de calciu necesar eliberării mediatorului. În absența lor, influxul de calciu crește semnificativ odată cu eliberarea acetilcolinei (99).

Scanned with OKEN Scanner

2.2. Distrofiile musculare progresive

Distrofiile musculare progresive umane reprezintă un grup de afecțiuni determinate genetic, caracterizate prin degenerescență lentă și progresivă a mușchiului striat, încă insuficient explicată. Se descrie o mare varietate de forme clinice ale distrofiei musculare legate de variabilitatea defectului genetic (tabelul V).

TABEL V

Caracteristici genetice ale principalelor forme de distrofie musculară progresivă (DMP)
(modificat după 182)

Forma clinică	Geno-/Feno-tip	Incidență
DMP Duchenne	X recesiv (90%) (autosomal recesiv 10%)	77
DMP Becker-Kienev	X recesiv	72, 177
DMP facio-scapulo-humerală	autosomal dominantă (sporadic-recesivă)	112, 177
DMP de centură	autosomal recesiv (sporadică)	181, 85

2.2.1. *Aspecte clinice (182)*

Manifestarea clinică cardinală a îmbolnăvirii este deficitul motor care se generalizează treptat, ca o consecință a atrofiei musculare simetrice progresive care se instalează și evoluează diferit în funcție de forma clinico-genetică. Frecvent aceste atrofii sînt mascate de adipozitatea accentuată, iar unele grupe musculare (molet, deltoid, maseter, limbă) sînt hipertrofice. Pe parcursul evoluției apar și se dezvoltă retracții tendinoase, iar în stadiile finale deformări osoase. Reflexele osteotendinoase și osteomusculare se reduc treptat pînă la dispariție. Apar de asemenea manifestări de cardiomiopatie distrofică și insuficiență respiratorie.

2.2.2. *Aspecte paraclinice*

Electromiografic distrofiile musculare se caracterizează prin absența activității bioelectrice spontane, reducerea amplitudinii traseelor cu peste 30%, reducerea duratei medii a potențialelor de acțiune cu peste 80%, absența gradării și a traseelor de interferență. În serul pacienților cu distrofie apar descărcări de enzime de origine sarcoplasmatică (de ex. CPK). Examenul biopsic, deși nu evidențiază nici o leziune caracteristică, este sugestiv prin gruparea unui ansamblu de leziuni nespecifice.

2.2.3. *Patogenie*

2.2.3.1. *Alterările morfofuncționale sarcolemale*

Deși în geneza distrofiei musculare au fost incriminate și alte mecanisme (teoria „vasculară", teoria „neurogenă"), cel mai plauzibil rămîne mecanismul miogen. Defectul genetic, indiscutabil demonstrat, stă probabil

Scanned with OKEN Scanner

la baza unor variate tulburări metabolice musculare a căror localizare pare a fi primordial sarcolemală (242). Mai mult, numeroase date tind să sublinieze că acest defect membranar nu este limitat la teritoriul sarcolemal, putînd fi regăsit și la alte populații celulare din organism. Deși mușchiul este o țintă importantă în distrofii, defectul genetic are o expresie pleiotropă în numeroase organe și sisteme. Aceste deficite pot să nu fie exprimate în toate țesuturile. Importanța relativă a defectului biochimic în metabolismul unui organ specific poate determina importanța participării țesutului la spectrul simptomelor clinice. Dealtfel acesta este și motivul pentru care unii autori au susținut ipotezele „neurogenă" și „vasculară". Cum nu existau dovezi convingătoare în sprijinul acestor teorii, cea mai rezonabilă ipoteză de lucru pare a fi cea conform căreia defectul genetic este exprimat independent în numeroase țesuturi. Niciun model animal de distrofie nu s-a dovedit pînă în prezent a prezenta manifestările clinice și fiziologice ale distrofiei umane. Presupunînd că defectul este exprimat în numeroase organe și sisteme, se pot utiliza în scop diagnostic hematiile, leucocitele, culturile tisulare etc. Valoarea acestei metode trebuie să fie la fel de mare în distrofii ca și în alte tulburări metabolice cu substrat genetic (7).

Studiile de microscopie optică și electronică pe biopsii de la pacienți nu au adus date certe cu privire la lezarea specifică a sarcolemei în distrofia Duchenne (cit. 116). deși majoritatea observațiilor pledează în acest sens (242). Pe culturi de biopsii umane obținute de la pacienți, celulele distrofice tind să se aglomereze mai rapid, iar dimensiunile acestor aglomerări cresc atît prin diviziune cît și prin încorporarea celulelor adiacente considerată a se datora unei adezivități crescute a suprafeței sarcolemale (242). Pe de altă parte, în studii pe culturi de celule miogene normale și distrofice de la pasăre nu s-au putut pune în evidență diferențe evidente în topografia proteinelor sarcolemale de suprafață în limitele de sensibilitate ale metodei de marcare utilizate (204). O serie de argumente pledează totuși în favorarea unor alterări ale structurii și funcției sarcolemale în distrofia musculară progresivă (cit. 116). În această categorie ar intra de exemplu datele ce demonstrează efluxul de enzime (aldolază, creatinchinază) din mușchi, sau penetrarea fibrelor musculare distrofice umane și de șoarece de către trasori extracelulari. S-au descris leziuni biochimice sarcolemale, incluzînd concentrații anormale de fosfolipide și colesterol (10), precum și alterări ale activității unor enzime membranare (194). Datele morfologice sînt mai consistente (81). În distrofiile musculare umane și murine apar alterări ale legării concanavalinei A și lecitinelor de sarcolemă, o creștere a densității caveolelor, scăderea rețelelor rotogonale de particule intramembranare, precum și reducerea densității acestora, evidențiată de altfel și la mușchiul cardiac de hamster cu distrofie (81). Particulele intramembranare ar include receptori, proteine generale ale membranei și enzimei (ATP-aza de Ca^{2+}) (81). O serie de autori (cit. 81, 181, 182) au pus în evidență existența unor discontinuități sarcolemale (leziuni delta), dar astfel de observații nu au putut fi reproduse în studiu de congelare-fractură. Argumentele funcționale în favoarea unei interesări primare a sarcolemei sînt destul de numeroase (137). În distrofia murină (sușele Rej-129 și C57BL) potențialul de repaus este redus cu circa 20%, rezistența membranară cu 28%, constanta de lungime cu 20%, amplitudinea potențialelor de acțiune cu 30%, iar viteza de depolarizare cu 20%. Aceste modificări preced alterările ultrastructurale observabile și par

Scanned with OKEN Scanner

a fi legate de modificări biochimice dinamice ale canalelor de K^+, Cl^- și/ sau Na^+ (116). Aceste rezultate s-au confirmat și pe biopsii de la pacienți cu distrofie Duchenne (86).

Este de reamintit în acest context ipoteza conform căreia lezarea genetică a sarcolemei ar determina un influx accentuat de Ca^{2+}. Creșterea concentrației de Ca^{2+} liber ar determina lezări mitocondriale, scăderea producerii de energie, supercontracția miofibrilară cu sfișierea sarcolemei și necroză finală (140).

În ceea ce privește aparatul contractil muscular, deși numeroase studii au pus în evidență alterarea sa funcțională și morfologică, datele obținute pînă în prezent pe animale și om nu par să susțină caracterul primar al acestor leziuni (47,121). Într-o formă de distrofie musculară murină și de pasăre, asociată cu creșterea concentrației glucocorticoizilor circulanți, s-a observat o creștere semnificativă a receptorilor specifici în citoplasma mușchilor distrofici (57).

2.2.3.2. *Alterări membranare la nivelul altor populații celulare*

Considerînd distrofiile musculare și în special cea de tip Duchenne ca fiind consecința unui defect genetic membranar generalizat, numeroși autori și-au îndreptat eforturile spre găsirea acestor defecte și la alte celule mai ușor de obținut și investigat (146). Majoritatea acestor cercetări s-au realizat pe hematii. Încă de la început investigațiile au evidențiat deformări evidente ale hematiilor obținute de la pacienți (12,151). Aceste modificări au fost puse pe seama unei deformabilități scăzute, prezentă atît la pacienți cît și la mamele purtătoare ale defectului (169). Nu în toate cazurile aceste observații au putut fi reproduse (75), iar valoarea diagnostică a determinării modulului de elasticitate eritrocitar pare a fi mai redusă decît s-a crezut inițial. Fragilitatea osmotică a eritrocitelor de la pacienți cu distrofie musculară progresivă nu este modificată semnificativ (120), deși uneori s-au observat valori crescute (70), iar în distrofia ereditară canină s-au evidențiat scăderi (1). În distrofia ereditară la hamsteri sirieni (UMX-7.1) durata de viață a hematiilor este cu 20% mai mare, iar hematocritul cu 10% mai redus, rata metabolică fiind în general scăzută (219). Studii de rezonanță electronică de spin au evidențiat în membranele eritrocitare de pacienți distrofici alterarea conformației și/sau organizării proteinelor structurale, precum și scăderi ale fluidității stratului bilipidic (23). În astfel de hematii unii autori au observat activarea ATP-azei (Na^+ — K^+)-dependente de către ouabaină și creșterea activității proteinchinazelor (cit. 23). Mobilitatea electroforetică a hematiilor de pacienți sau purtătoare scade în prezența ouabaïnei (214). Astfel de eritrocite prezintă anomalii spectrofluorimetrice (203), iar studii de microscopie electronică de congelare-fractură au evidențiat scăderi semnificative ale densității particulelor intramembranare (231). Deși compoziția chimică a lipidelor precum și activitatea acyl-CoA sintetazei și carnitin palmitoil transferazei nu diferă față de normal în membranele hematice ale pacienților cu distrofie musculară Duchenne (154, 195), organizarea fosfolipidelor membranare este anormală. S-au pus în evidență concentrații crescute de fosfatidilcolină în stratul extern al membranei hematice (104). Aceste modificări de organizare s-ar putea datora unei creșteri a vitezei, de translocare

Scanned with OKEN Scanner

a fosfatidilcolinei, care s-ar părea că nu este străină de alterări ale citoscheletului membranar și, în primul rînd, ale spectrinei (cit. 104). Rata de fosforilare a spectrinei și a proteinei din banda 3 sînt semnificativ crescute la pacienții cu distrofie musculară Duchenne față de normali (225). Creșterea activității proteinchinazice este însoțită de creșteri ale activității adenilatciclazice în membranele hematice obținute de la pacienți și purtătoare ale distrofiei musculare tip Duchenne (109, 148, 192, 230). Cum defectele membranare descrise s-ar putea reflecta în metabolismul hematic, o serie de cercetări s-au dirijat spre găsirea unor astfel de consecințe metabolice. Hematiile miodistrofice prezintă o reducere a ratei de glicoliză (108).

Defectul membranar sistemic apare nu numai în cazul hematiilor. Pe limfocite de la pacienți cu distrofie musculară progresivă sau de la purtătorii heterozigoți, s-au pus în evidență alterări ale fluidității de membrană, demonstrate atît prin rezonanță electronică de spin cît și prin reducerea agregării complexelor fluorescente antigen-anticorp de pe suprafața limfocitelor B (fenomen de „*capping*") (180). Trombocitele miodistrofice prezintă tulburări de agregare. Răspunsul agregant la ADP și adrenalină este inhibat, în timp ce agregarea cu acid arahidonic și colagen sînt păstrate (241). În același studiu, examinarea electronmicroscopică a evidențiat o densitate mult crescută a corpilor denși precum și predominanța trombocitelor de tip 2, metalofilic. S-au evidențiat de asemenea creșteri semnificative ale concentrației calciului plachetar (241). Pe culturi de fibroblaști cutanați de la pacienți miodistrofici, nu s-au putut evidenția tulburări ale schimburilor de Ca^{2+} (212). Pe același tip de culturi s-a demonstrat existența unor anomalii sistematice de organizare a membranei, similare celor observate în cazul hematiilor (206). Fibroblaștii de la pacienți cu distrofie musculară Duchenne nu prezintă modificări ale ATP-azelor membranare ($Na^+—K^+$; Ca^{2+}; Mg^{2+}) și nici ale 5'-nucleotid fosfatazei, în timp ce activitatea gammaglutamil transpeptidazei este evident mai mare decît la normali (155). Creșterea conductanței pentru Cl^-, observată pe aceleași linii celulare, ar putea explica unele manifestări de excitabilitate scăzută a membranelor musculare observate în distrofiile de tip Duchenne, precum și scăderea activității unor enzime lizozomale (dipeptidil aminopeptidaza I) (166).

2.3. Miotoniile

Miotoniile sînt un grup de boli ereditare, distincte din punct de vedere genetic, caracterizate prin malfuncții musculare specifice (181, 182, 21, 153, 196, 197, 233).

2.3.1. *Aspecte clinice generale*

Caracteristica cea mai generală a îmbolnăvirii este apariția unei tensiuni musculare tranzitorii și necontrolabile în timbul contracției musculare voluntare. Această tensiune se datorează unei incapacități temporare a mușchiului de a se relaxa normal. Contracția se prelungește dînd senzația de rigiditate musculară, care adesea se combină cu astenie sau adinamie musculară — scăderea forței musculare. Criza miotonică apare mai frecvent cînd pacientul începe o activitate după o perioadă de relaxare. Prima con-

tracție este normală și apoi apare redoarea care atinge un maximum după 3—4 contractații. Continuarea activității determină o scădere treptată a miotoniei (fenomen de încălzire-„*warm-up*"). Uneori, în așa-zisa miotonie paradoxală, rigiditatea se accentuează odată cu continuarea activității. Se consideră că o parte a rigidității musculare din miotonie s-ar datora așa-zisului postspasm miotonic de origine reflexă nervos centrală. S-a descris și așa-zisa miotonie de percuție, în care mușchiul miotonic lovit cu un ciocan de reflexe devine spastic.

Mușchii miotonici au un prag de excitabilitate scăzut și tendința de a răspunde prelungit la stimuli electrici direcți (reacție miotonică). Din punct de vedere electromiografic, mușchiul miotonic se caracterizează prin salva miotonică — o scădere repetitivă de frecvență mare (90—150 Hz) de potențiale care, după un maximum atins la începutul descărcării, se reduc treptat în 1—5 sec. și nu sînt afectate de curarizare. Se descriu și așa-zise neuromiotonii în care manifestările bioelectrice, fiind de origine nervoasă, pot fi blocate de curara. În unele afecțiuni neuromusculare, în special cele legate de denervare, apar salvele zise pseudomiotonice, rezistente la curara.

Clasificarea sindroamelor asociate cu miotonie se realizează pe baza caracteristicilor clinico-genetice.

2.3.1.1. *Miotonia congenitală*

Numită și miotonie pură (181, 182), această entitate apare în două forme clinico-genetice distincte:

a) *Miotonia autosomal dominantă ereditară de tip Thomsen*, descrisă încă din 1876 (cit. 182), apare cu o incidență de circa 1/23.000 (196), prezintă toate simptomele tipice miotoniilor (crampe, redoare, scăderi ale forței musculare, hipertrofie musculară) dar într-o formă moderată. Sînt afectate de obicei cîteva grupe musculare (limbă, orbicularul pleoapelor, musculatura distală a membrelor). Datorită variabilității fenotipice s-au putut descrie 4 forme clinice cu numeroase similitudini.

b) *Miotonia autosomal recesivă dominantă de tip Becker*, descrisă abia în 1957 (cit. 196) și avînd o incidență de 1/50.000, îmbracă forme generalizate mai severe decît în miotonia Thomsen. Simptomele nu apar congenital, sînt prezente la 15—20% din membrii unei familii și se agravează treptat, dar limitat. Unii bolnavi prezintă fenomenul de încălzire la unele grupe musculare în timp ce la alte grupe apare miotonia paradoxală cu accentuarea rigidității. Purtătorii heterozigoți ai genei recesive pot fi detectați prin semnele EMG de miotonie latentă. Din punct de vedere morfopatologic fibrele musculare pot prezenta atrofii și nuclei centrali.

2.3.1.2. *Paramiotonia congenitală*

Descrisă de Eulenburg în 1886, afecțiunea se caracterizează prin contractură tonică ce apare la frig, este exacerbată de continuarea activității și nu cedează decît la căldură fiind urmată de o perioadă de scădere a forței musculare (196). Dacă expunerea la frig este de durată apar scăderi de forță musculară mergînd pînă la paralizie. Frecvența bolii a fost apreciată la

Scanned with OKEN Scanner

n/178.000. Din punct de vedere genetic este o afecțiune autosomal dominantă, cu penetrație aproape totală la heterozigoți de ambele sexe. Morfologic s-au descris ocazional atrofii și alterări la nivelul triadelor.

2.3.1.3. *Distrofia miotonică Steinert*

Avînd o frecvență variabilă între 1/18.000 și 1/7.500 (cit. 196), distrofia miotonică Steinert este determinată de o genă pleiotropă autosomală dominantă, a cărei expresie este puternic modulată de alele agravante sau atenuante (181, 182). Boala are o simptomatologie complexă, incluzînd manifestări musculare distrofice (miotonie inițială, distală, urmată de amiotrofii distale simetrice cu deficit motor progresiv), atrofie gonadală, cataractă, surditate, alterări psiho-intelectuale, cardiomiopatie, lezări ale musculaturii netede. Fibrele musculare prezintă numeroase alterări histopatologice (atrofii, nucleii centrali, fragmentarea fibrelor, agregate tubulare etc.). Boala are un debut tardiv (20—30 ani) și o progresie continuă a simptomelor.

2.3.1.4. *Alte forme de distrofie miotonică*

a) *Miotonia condrodistrofică* (sindrom Schwartz și Kampel) este o afecțiune congenitală autosomal recesivă cu incidență foarte redusă. Se caracterizează prin coexistența miotoniei cu nanism, deformări scheletice diverse, anomalii oculare și faciale. Miopatia este generalizată și determină scăderea accentuată a forței musculare. Miotonia de percuție este foarte evidentă. Rigiditatea prezintă fluctuații în cursul mișcărilor active. Este posibil ca în cursul bolii să intervină elemente de neuromiotonie (activitate EMG spontană continuă) . Din punct de vedere morfopatologic s-a semnalat existența corpilor lamelari denși subsarcolemali și interfibrilari, precum și alterări hiperplazice inconstante ale plăcilor motorii (cit. 182).

b) *Miotonia distrofică congenitală și infantilă.* Manifestată prin tulburări de supt, apare la copiii mamelor miotonice și se asociază cu alte dismorfii congenitale osteomusculare. Debutează cu hipotonie, miotonia devenind manifestă după vîrsta de 9 luni. Se caracterizează printr-o rată de mortalitate foarte ridicată.

2.3.2. *Modificări membranare în miotonii*

Datorită similitudinilor clinice și electrofiziologice s-a considerat multă vreme că, la baza diferitelor forme de miotonie ar sta același mecanism patogenetic general. Modificările acestui mecanism sau combinarea sa cu alte defecte ar fi explicat variabilitatea observată. Abia utilizarea mușchiului intercostal extern uman izolat *in vitro* a creat condiții adecvate pentru investigarea fiziopatologiei miotoniilor umane. Tabelul alăturat prezintă asumativ parametrii membranari ai fibrelor de mușchi intercostali izolate *in vitro* atît de la voluntari normali cît și de la pacienți cu diverse forme de miotonie (tabel 6). Aceste date au demonstrat clar că există mecanisme patogenetice diferite în funcție de tipul de miotonie.

Scanned with OKEN Scanner

Faptul că în miotonia congenitală de tip Thomsen defectul membranar este o scădere marcată a conductanței pentru clor, a fost sugerat pentru prima oară de studiile *in vitro* cu microelectrozi intracelulari efectuate pe mușchi de capră cu miotonie. Cu toate că acest model animal de miotonie congenitală nu reproduce în totalitate afecțiunea umană, datele obținute au permis dezvoltarea ipotezei de lucru menționată care s-a confirmat în studii pe mușchi uman (cit. 197). Studiul proprietăților pasive ale membranei fibrelor musculare miotonice umane și de capră nu a evidențiat modificări semnificative ale potențialului de repaus transmembranar *in situ* sau *in vitro* (197). În cercetările efectuate de Lipicky și colab. (123, 140, 141, 142, 143) fibrele de la cei patru pacienți cu miotonie congenitală. Thomsen (tabelul 6) au avut o rezis-

TABEL VI

Parametrii membranari ai fibrelor din mușchi intercostal uman
(Modificat după 196)

Sursa	Nr. pacienți	PR (mV)	Cm ($\mu F/cm^2$)	Gm ($\mu S/cm^2$)	G_{K+} ($\mu S/cm^2$)	G_{Cl} ($\mu S/cm^2$)	%	Ref.
Martori normali	5	−70,8(59)	6,2	506(154)	106	500	82	140, 141
	15	−83,3(221)	4,7	175(121)	42	133	76	123
Miotonia congenitală	4	−75,0(36)	5,9	92	64	28	30	142, 143
	2	—	—	557	101	456	82	142, 143
	5	—	—	71	45(119)	26	37	140, 141
Distrofia miotonică	4	−82,0(43)	5,3	538	95	443	82	140, 141
	2	—	6,6	181	85	96	53	140, 141
Paramiotonia congenitală 37°C	7	−81,0(257)	4,2(36)	152	43	113	71	130, 132
	7	−40,6(278)	4,2(36)	367	45	380	89	130, 132
Paralizie periodică hiperkaliemică cu miotonie	1	−83,0(72)	—	150	57	93	62	131

Numărul fibrelor în paranteză, *PR*: potențial de repaus; *Cm;* capacitatea fibrei; *Gm;* conductanța specifică; *Gk;* componenta potasică a conductanței; *GCl;* componenta clorică a conductanței. Condițiile de determinare au variat în funcție de autorii citați.

tență de repaus a membranei de circa 3-4 ori mai mare decît la normal. Această scădere a conductanței membranare (Gm) se datora exclusiv unei reduceri a conductanței pentru Cl^- la numai 30% din conductanța totală, în comparație cu valoarea normală de 80%. Această scădere a fost ulterior confirmată de alte studii (140, 141). Este de subliniat faptul că, în studiul citat, la alți doi pacienți, avînd probabil forma recesivă Becker de miotonie congenitală, rezistența membranară și conductanța pentru clor nu au fost modificate (tabelul 6). Posiblitatea ca deficitul conductanței pentru clor să fie un defect membranar generalizat este sugerată de apariția sa la nivelul ramului ascendent subțire al ansei Henle. La pacienții cu miotonie congenitală acest defect reduce capacitatea de concentrare a urinii (26).

Restul proprietăților pasive ale sarcolemei fibrelor miotonice sînt în linii mari normale, atît la om cît și pe modelul caprin. Raportul GNa^+/GK^+

Scanned with OKEN Scanner

se menține normal (0,010± 0,002), ca de altfel și conținutul în K^+. Nu s-a putut evidenția apariția unui eventual transport activ de Cl^- (51). Rezistența internă este redusă (de la 123 la 75 ohmi cm), iar capacitatea membranară ușor crescută (de la 5,2 la 7,9 micro F/cm²). Efluxul de K^+ este normal, ca de altfel și conținutul în K^+, Na^+ și Cl^- (142).

Pe fibrele musculare de la capre cu miotonie potențialul de acțiune evocat prin stimulare unică este urmat de un postpotențial depolarizant prelungit, cu scăderea valorilor reobazei pentru stimulii următori (20). Activitatea repetitivă și depolarizarea prelungită prin postpotențial au făcut dificilă determinarea acestor parametri. *Overshoot*-ul pare normal, iar depolarizarea critică a fost redusă. Apariția postpotențialului depolarizant și tendința la descărcare repetitivă după un stimul unic au putut fi explicate în cazul potențialului de acțiune miotonic prin scăderea conductanței pentru Cl^- în cadrul unor simulări matematice pe calculator (utilizînd modelul Hodgkin-Huxley) (197). Modelul nu explică totuși în întregime caracteristicile potențialului de acțiune miotonic.

Un alt fapt de observație, care a contribuit la o înțelegere mai bună a mecanismelor implicate în miotonia congenitală, este acumularea tubulară a K^+. Depolarizarea de lungă durată, care se dezvoltă în cursul stimulării repetitive a fibrelor musculare de la capre cu miotonie, este abolită prin detubulare K^+ care părăsește fibra în cursul activității evocate se acumulează la nivelul tubilor în T. În cazul fibrelor musculare cu conductanță pentru Cl^- normală, acumularea K^+ nu determină o depolarizare mai mare de 0,1 mV per potențial de acțiune. Deplasările Cl^- în gradient electrochimic compensează depolarizarea și o împiedică să ajungă la valori critice. Potențialul de echilibru al Cl^- este apropiat de — 80 mV. Cînd conductanța pentru Cl^- este scăzută (miotonie), acumularea K^+ în tubii T determină depolarizări de circa 1 mV per potențial de acțiune. Aceste depolarizări care durează cîteva secunde se sumează și determină o postdepolarizare tot mai accentuată, care generează activitatea repetitivă. Utilizîndu-se un model matematic de membrană, care includea un sistem tubular activ cu acumulare de K^+, s-a putut reproduce descărcarea miotonică (96). Modelul a sugerat însă și posibilitatea intervenției unei anomalii a canalelor de sodiu care ar trebui să existe pentru a se putea explica complet instabilitatea critică a membranelor miotonice. Cercetări sistematice privind canalele ionice de clor s-au realizat mai ales pe modelul miotoniei la capră, dar rezultatele sînt probabil pertinente și în cazul miotoniei umane Thomsen. Există 3 explicații posibile pentru defectul canalului de clor în miotonie: — scăderea numărului de canale, ocluzia lor printr-o substanță endogenă și, în fine, scăderea selectivității pentru Cl^- (196).

Posibilitatea ocluziei canalelor de Cl^- de către o substanță endogenă a fost sugerată de experimentele în care aplicarea de acizi aromatici monocarboxilici determină apariția miotoniei prin blocarea canalelor de clor (153, 196). Deși prezența unui agent umoral cauzal a fost la un moment suspectată, mai ales în miotonia ereditară la capre (51, 143), totuși nu s-au obținut dovezi concludente în acest sens. Argumentele în favoarea acestei ipoteze de blocare sau alterare a selectivității canalelor de clor au fost rînd pe rînd infirmate de cercetări mai recente (21). Singura ipoteză plauzibilă astăzi pare a fi cea conform căreia, în miotonia congenitală tip Thomsen are loc o scădere a numără-

Scanned with OKEN Scanner

lui canalelor de clor legată fie de un deficit de sinteză fie de o interferare a incorporării canalelor în membrană datorită alterării lipidelor membranare (21, 197).

S-au descris și alterări miotonice ale canalelor de Na^+ și K^+. Experimentele de potențial clampat pe fibre musculare de capră cu miotonie au scos în evidență modificări ale cineticii inactivării canalelor de Na^+. Inactivarea este mai lentă în fibrele miotonice și se suprapune peste curba de activare semimaximală, determinînd creșterea curentului de Na^+ depolarizant. Pe de altă parte, în cazul canalelor de K^+ curentul de ieșire întîrziat cu rol rectificator este de două ori mai mare în fibrele musculare cu miotonie, ceea ce sugerează o dublare a densității canalelor de K^+ în mușchii afectați. Simulările pe calculator au demonstrat că defectele descrise în cazul celor două tipuri de canal agravează miotonia, dar nu o pot produce decît cu condiția existenței unui deficit semnificativ al canalelor de Cl^-. Acesta rămîne principalul factor în cazul miotoniei ereditare animale (21).

Comparînd compoziția în acizi grași a lipidelor sarcolemale de la 8 pacienți cu miotonie congenitală (cîte 4 pentru fiecare tip) cu cea determinată la 8 voluntari normali, Kuhn și Seilev (cit. 197) au observat diferențe semnificative. Tipul dominant Thomsen diferă de tipul recesiv Becker și de normali prin creșterea acizilor palmitic, stearic și eicosotrienoic și scăderea acizilor oleic, linoleic și arahidonic. Se poate afirma că forma dominantă se caracterizează printr-un defect structural, în timp ce forma recesivă este legată de un defect enzimatic.

Tratamentul patogenetic cel mai firesc în miotoniile cu defect al conductanței pentru clor ar fi administrarea unei substanțe care să normalizeze această conductanță. Un astfel de medicament nu este deocamdată disponibil. Diazepamul, care mărește gCl^- *in vitro*, nu s-a utilizat în clinică. Acidul gama-aminobutiric (GABA) nu modifică canalele de clor din mușchiul de mamifer (21). Antibioticele, ce acționează ca ionofori de Cl^- sînt înalt nefrotoxice iar amfotericina B care mărește $g\ Cl^-$ în membrane artificiale nu este activă pe diafragmul de șobolan.

În încercarea de a reduce K^+ circulant (factor agravant) s-a recurs la tratamentul cu rășini schimbătoare de cationi, care s-a dovedit pînă la urmă lipsit de efecte practice ba chiar implicînd riscuri grave (197).

Doar blocanții canalelor rapide de Na^+ par a fi utili în toate tipurile de miotonii. Începînd cu chinina și continuînd cu procainamida, difenilhidantoina, sparteina, N-propilajmalina, chinidina, o serie de droguri din această categorie s-au dovedit a avea acțiuni antimiotonice. Substanțe antiaritmice recente (tocainid, mexiletin) atrag astăzi atenția. Datorită inactivării lente, ele pot realiza concentrații circulante mari pe timp îndelungat (197).

2.3.2.2. *Paramiotonia congenitală*

Cum nu există un model animal pentru această miotonie declanșată de scăderea temperaturii, cercetarea patogeniei sale nu s-a putut realiza decît pe fibre musculare umane (130, 132). Parametrii electrofiziologici ai acestor fibre sînt normali la 37°C (tabel 6). Cînd temperatura scade la 27°C, potențialul de repaus se reduce spontan. La atingerea valorii de — 60 mV apar trenuri de descărcări electrice spontane de lungă durată (1—5 Hz).

Scanned with OKEN Scanner

În cursul acestor descărcări potențialul de repaus se reduce în continuare pînă la oprirea activității (la — 50 mV) și oprirea depolarizării (la — 40 mV). După stimulare depolarizarea se accentuează și toate fibrele sînt afectate. În astfel de fibre conductanța membranară este crescută pentru Na^+ și Cl^- și nu se modifică pentru K^+. Reîncălzirea sau aplicarea de TTX nu normalizează potențialul de repaus și conductanța membranară. În schimb, aplicarea de TTX pe mușchiul izolat la temperatura de 37°C previne instalarea miotoniei la răcire. Același efect preventiv îl are și administrarea de antiritmice (tocainid sau mexiletin). Se consideră că în aceste forme de paramiotonie congenitală depolarizarea se explică printr-o dependență anormală de temeperatură a conductanței canalelor de sodiu, care ar reprezenta defectul primar. Creșterea conductanței pentru clor la 27°C în prezența TTX, observată inițial (130), nu a fost confirmată în studii ulterioare (132). În absența TTX depolarizarea la rece determină creșteri ale conductanței pentru clor conform ecuației Goldman. S-a descris un caz de paramiotonie asociată cu miotonie (130). La temperatură obișnuită pacientul prezenta miotonie cu fenomen de încălzire, iar la rece se dezvoltă paramiotonia. În acest caz conductanța la clor era scăzută la temperatură normală, în timp ce la rece conductanța la clor creștea mult odată cu cea pentru sodiu.

Dacă scăderea forței în paramiotonie se explică ușor prin depolarizarea de durată a membranei, rigiditatea paramiotonică este disproporționat de accentuată în comparație cu durata și intensitatea activității repetitive involuntare. Cel puțin deocamdată nu s-a putut evidenția vreun alt defect localizat în aparatul contractil, reticulul sarcoplasmic sau cuplarea excitație-contracție (130, 132). Compoziția lipidică a sarcolemei este modificată în paramiotonie. S-a descris o creștere a dimetilacetaților și scăderi ale cantității de acid oleic. S-a observat și o scădere drastică a proporției de sfingomielină, care a fost semnalată și în membranele hematice la alt pacient cu paramiotonie (cit. 197). Colesterolul membranar pare a fi normal.

2.3.2.3. *Miotonia condrodistrofică*

Descărcările electrice persistente, care apar în toți mușchii scheletici la pacienți cu sindrom Schwartz-Jampel, sînt, cu rare excepții, abolite de curara. Mișcări voluntare minime, inserția acului EMG sau percuția mușchiului declanșează activități repetitive regulate. Acest fenomen s-ar explica prin persistența transmiterii efaptice embrionare la fibrele mușchiului adult. Conducerea electronică prin efapse ar permite apariția unor curenți circulari care persistă îndelungat. Nu există deocamdată dovezi electronomicroscopice în acest sens.

2.3.2.4. *Distrofia miotonică*

Datele obținute pînă în prezent nu au permis emiterea unei ipoteze patogenetice clare. Observațiile electrofiziologice sînt în general contradictorii. Studiile inițiale, efectuate *in vitro* pe fibre musculare de la pacienți, păreau să evidențieze scăderi ale potențialului de repaus și creșteri ale concentrației sodiului intracelular, determinate de creșterea conductanței de repaus pentru Na^+ și alterarea stoichiometriei pompei de $Na^+ — K^+$ (197). Cercetări ulterioare (140, 141) au demonstrat menținerea la valori ridicate a potențialului de repaus și reducere a Na^+ citoplasmatic. Curentul rapid de

Scanned with OKEN Scanner

Na^+ și densitatea canalelor de Na^+ sînt normale. Potențialele de acțiune au o latență crescută și un *overshoot* mai redus, iar activitatea repetitivă nu este foarte accentuată *in vitro*. S-au evidențiat scăderi ușoare ale conținutului de apă și potasiu, precum și ale efluxului de K^+. S-au descris și scăderi semnificative dar inconstante ale conductanței pentru clor. Avînd în vedere paucitatea și incoerența acestor date se poate doar remarca faptul că mecanismul patogenetic pare a fi foarte diferit de cel incriminat în miotonia congenitală. S-au descris și anomalii de comportament mecanic care ar putea sugera existența unor anomalii ale sistemelor membranare legate de cuplarea excitație-contracție (140).

Cercetările efectuate pe culturi aneurale de fibre de la pacienți cu distrofie miotonică sînt contradictorii și neconcludente deși, la un moment dat, observațiile păreau să indice existența unei anomalii a conductanței pentru potasiu. Cel puțin deocamdată depistarea unui defect genetic precis pe astfel de culturi ar putea fi împiedicată de maturarea incompletă a acestor celule.

Datele privind alterarea ATP-azelor membranare nu sînt mai concludente (cit. 130). Captarea calciului în vezicule sarcoplasmice a fost crescută în unele cercetări și scăzută în altele. Captarea calciului în eritrocitele pacienților a fost crescută. Legarea ouabainei de sarcolemă a fost găsită crescută de 2—3 ori, dar și scăzută de 3—6 ori. Ouabaina nu pare să afecteze semnificativ miotubii normalii sau de la pacienți, ceea ce ar demonstra că ATP-aza ($Na^+—K^+$) nu ar fi implicată direct în descărcarea repetitivă. În hematiile pacienților cu miotonie distrofică efluxul de Na^+ ouabaïn-sensibil pare a fi redus, raportul stoichiometric Na^+/K^+ scăzînd de la 3/2 la 2/2. În alte cercetări această modificare nu a putut fi evidențiată. Pe fantome de hematii activitatea ATP-azelor (Na^+ — K^+) și (Ca^{2+} — Mg^{2+}) a fost normală sau variabil afectată (147, 222). Presupunerea existenței unui defect membranar generalizat a determinat cercetări extinse la nivelul membranei hematice. Cu metode biofizice și biochimice s-au pus în evidență scăderi ale proteinchinazelor și fosforilărilor membranare, confirmate ulterior pe sarcolemă, precum și o scădere a efluxului de K^+ calciu-dependent. Conținutul în ATP al membranei hematice nu a fost găsit modificat (200). Cercetări de rezonanță electronică de spin au evidențiat alterări ușoare ale polarității și fluidității membranelor, care abia urmează a fi confirmate (74). Hematiile pacienților sînt mai rezistente la liza hipoosmotică, datorită probabil unei rigidități crescute (222). În aceste experimente nu s-au observat diferențe în ceea ce privește ATP-azele de calciu membranare, conținutul în acid sialic sau extractibilitatea spectrinei. În schimb, una dintre principalele proteine membranare hematice (banda 3) s-a demonstrat a fi mai fragilă decît în cazul hematiilor obținute de la normali (222). În același tip de membrane, conținutul în acid fosfatidic și activitatea enzimelor implicate în metabolismul acestui compus s-au dovedit a fi în limite normale (240).

O altă alterare membranară, semnalată relativ recent în fibrele musculare de la pacienți cu distrofie miotonică, este scăderea sensibilității la insulină. Alterarea membranară pare a reduce numărul acestor receptori. Pacienții se caracterizează printr-o rezistență generală la insulină, în condițiile unui nivel bazal normal al hormonului circulant.

Scanned with OKEN Scanner

În distrofia miotonică miotonia nu reprezintă un impediment major. Din acest motiv și terapia simptomatică este rareori necesară. Anestezicele locale, difenilhidantoina și antiaritmicele rezolvă de obicei cu succes tulburarea.

2.3.2.5. *Miotoniile experimentale*

În afara miotoniei ereditare la capre, în unele studii experimentale s-au utilizat modele de miotonie indusă chimic. Cele mai cunoscute sînt miotonia indusă cu acid antracen-9-carboxilic (9-AC), precum și cea cu 20,25-diazacolesterol (20,25-D).

Miotonia cu 9-AC realizată *in vivo* sau *in vitro* se aseamănă cu miotonia congenitală forma dominantă. Substanța reproduce mecanismul patogenetic, blocînd canalele de clor (197).

Miotonia cu 20,25 D este din unele puncte de vedere asemănătoare cu miotonia distrofică. Substanța acționează blocînd conversia desmosterolului în colesterol. Acumularea de precursor declanșează miotonia. De altfel acest tip de miotonie a fost observat pentru prima oară la un grup de pacienți hipercolesterolemici tratați timp de cîteva luni cu 20,25 D. Activitățile ATP-azelor de $Na^+ — K^+$ și Ca^{2+} cresc semnificativ, iar conductanța pentru Cl^- scade relativ puțin (171). Este posibil ca acumularea membranară de desmosterol să stea la baza acestor modificări (9).

2.4. Paraliziile paroxistice diskaliemice

Prima descriere a unei paralizii paroxistice datează din 1890 (Goldflam cit. 182). Sub această denumire se reunește un ansamblu variat de sindroame caracterizate prin atacuri episodice de paralizie musculară, asociate de obicei cu modificări ale conținutului de potasiu în ser și mușchi.

2.4.1. *Aspecte clinice generale*

În funcție de modificările asociate ale concentrației potasiului seric se descriu trei tipuri de paralizie periodică:

— Paralizia periodică hipokaliemică
  — familială
  — tirotoxică
  — secundară unor dezechilibre electrolitice.
— Paralizia periodică hiperkaliemică.
— Paralizia periodică normokaliemică.

2.4.1.1. *Paralizia periodică hipokaliemică familială*

Paralizia periodică hipokaliemică familială este o tulburare autosomal dominantă. Atacurile apar după 20—30 ani și durează de la cîteva ore pînă la 1—2 zile. Deficitul se instalează treptat, fiind semnalat de o „aură" paretică. Parezele sînt de tip proximal, respectînd mușchii respiratori. Rareori se poate ajunge la paralizia flască. Tulburările se însoțesc de areflexie. Crizele

Scanned with OKEN Scanner

sînt precipitate de excesul de hidrocarbonate, repaus îndelungat după efort, anxietate. Reluarea efortului poate avorta atacul, ca și administrarea de săruri de potasiu. Criza este însoțită de scădere reversibilă a K^+ seric. K^+ muscular este redus iar Na^+ crescut.

2.4.1.2. *Paralizia periodică hipokaliemică tirotoxică*

Paralizia periodică hipokaliemică tirotoxică însoțește adesea hipertiroidia la pacienți asiatici (japonezi, chinezi). Tulburările sînt asemănătoare cu cele descrise mai sus, dar dispar odată cu tratarea corectă a condiției tiroidiene. Paraliziile episodice pot apare în hipokaliemii secundare hiperaldosteronismului, tratamentul cu insulină al comei diabetice, tratamentul cu diuretice etc.

2.4.1.3. *Paralizia hiperkaliemică periodică*

Paralizia hiperkaliemică periodică (adinamia episodică ereditară Gamstrop) este de asemenea o tulburare autosmal dominantă moștenită. Atacurile se asociază cu hiperkaliemie, durează 1—3 ore, tind să apară după eforturi puternice, foame, prînz cu exces de potasiu, scăderea temperaturii etc. Se descriu trei forme diferite: — asociată cu paramiotonia; — asociată cu miotonia latentă; — fără nici un semn de miotonie. Histopatologic se poate evidenția frecvent o miopatie vacuolară.

2.4.1.4. *Paralizia normokaliemică periodică*

Paralizia normokaliemică periodică este o entitate clinică rară, în care atacurile nu se însoțesc de modificări ale kaliemiei, pot fi uneori precipitate de administrarea de potasiu și nu pot fi induse de condiții ce reduc potasemia.

2.4.2. *Patogenie*

Faptul că paraliziile diskaliemice periodice sînt discutate laolaltă nu implică existența unui mecanism patogenic unic.

2.4.2.1. *Paralizia hipokaliemică periodică*

Scăderile accentuate ale potasemiei în timpul episoadelor paralitice (pînă la 1,5 mEq/l) se însoțesc de scăderi ale eliminărilor urinare de potasiu și creșteri ale concentrației K^+ în fibrele musculare (181, 182). La sfîrșitul crizei K^+ trece înapoi în circulație. Efluxul are loc chiar și atunci cînd s-au administrat săruri de potasiu. Insulina, epinefrina, tirotoxicoza, corticosteroizii, dieta hipopotasică, repausul îndelungat după efort fizic determinînd hipokaliemie sau influx de K^+ în mușchi, precipită atacul paralitic. Datele clinice și experimentale obținute pînă în prezent incriminează ca principal mecanism patogenetic inexcitabilitatea sarcolemei care devine incapabilă să genereze și mai ales să conducă potențialul de acțiune. Contracția continuă să apară dacă se aplică Ca^{2+} pe fibre paralizate cu sarcolema îndepărtată, ceea ce indică funcționarea normală a aparatului contractil. Faptul că uneori fatigabilitatea apare înaintea alterării potențialului compus de acțiune a sugerat posibilitatea existenței unui defect al mecanismului de cuplare excitație-contracție. Un astfel de defect s-ar putea datora vacuolizării sarcotubulare a fibrelor

Scanned with OKEN Scanner

musculare, care însă nu s-a demonstrat a fi o perturbare constantă și oricum este ierarhic plasată după fenomenul de reducere a excitabilității sarcolemale (181, 182).

Inexcitabilitatea sarcolemală nu este nici pînă astăzi clar explicată. Transmiterea neuromusculară nu pare a fi afectată, întrucît s-a demonstrat producerea potențialelor de placă motorie. Fibrele musculare, inexcitabile electric, au un potențial de repaus redus. Bazele ionice ale acestei reduceri nu sînt încă clarificate. Administrarea de insulină sau reducerea K^+ extracelular accentuează depolarizarea, în timp ce procaina sau reducerea Na^+ extracelular o previn. Aceste observații tind să explice depolarizarea printr-o creștere a raportului dintre conductanța membranară pentru Na^+ și cea pentru K^+, fără a putea distinge între cele două permeabilități. S-a emis presupunerea că, în cazul paraliziei episodice hipokaliemice ar fi modificată. voltaj-dependența canalelor de Na^+, care ar fi blocate la depolarizări mici. ale membranei sau chiar la valori normale ale potențialului de membrană. Ipoteza este încă departe de a fi evaluată. Studiile pe modele animale hipokaliemice par să indice că depolarizarea sarcolemei ar fi legată de o creștere semnificativă a conductanței pentru Na^+, la rîndul său, determinată de reducerea conductanței pentru K^+. Insulina determină, la rîndul său, scăderi ale permeabilității pentru K^+, ca și concanavalina A care activează receptorii la insulină. Rezumativ, mecanismele fatigabilității cronice și ale atacului paralitic în paralizia periodică hipokaliemică pot fi prezentate schematic în figura alăturată (fig. 13).

Posibilitățile patogenetice detaliate mai sus vin să explice efectele favorabile ale unor procedee terapeutice aplicate inițial empiric. Astfel, administrarea sărurilor de potasiu, mărind potasemia, determină compensarea gradientului de K^+, crește g K^+ și eventual repolarizează sarcolema. Negativarea bilanțului sodat prin dietă hiposodată, diuretice, spironolactonă, reduce probabil acumulările de Na^+ intramuscular, scade sensibilitatea la insulină, diminuează eventualul blocaj prin Na^+ al canalelor de K^+ (85). Tot un caracter profilactic are și dieta cu cantități reduse de hidrocarbonate care previne descărcările postprandiale de insulină. Efectele favorabile ale propranololului în prevenirea paraliziei la pacienți cu tirotoxicoză se explică probabil prin blocarea influxului de K^+ și hipokaliemie, determinate prin mecanisme beta-adrenergice. Blocarea anhidrazei carbonice cu acetazolamidă, determinînd un grad de acidoză metabolică, blochează efectele insulinei asupra influxului de K^+ și, prin exces de sarcini pozitive la nivelul sarcolemei, reduce gradul de depolarizare membranară (85, 196).

2.4.2.2. *Paralizia periodică hiperkaliemică*

Manifestarea caracteristică a acestei forme este atacul paralitic, însoțit de o creștere a kaliemiei pînă la valori de 5 mM și chiar mai mult. Deși redoarea musculară de tip miotonic apare inconstant, totuși la numeroși pacienți se descrie o activitate EMG spontană similară cu cea observată în miotonia și paramiotonia congenitală (cit. 196). Studiile *in vitro* pe mușchi intercostali curarizați (131) au demonstrat că paralizia este de origine intrinsecă, musculară, excluzînd intervenția unor factori neurogeni sau umorali cu excepția hiperkaliemiei. Între atacuri potențialul membranar de repaus al fibrelor este normal sau ușor coborît. S-a considerat că accentuarea depolarizării

Scanned with OKEN Scanner

declanșează atacul paralitic. La concentrații normale de K^+ fibrele de la pacienți au un potențial de repaus și conductanțe ionice normale. La creșterea concentrației de K^+ (6—7 mM) apare paralizia (131).

Defectul primar pare a fi diferit în funcție de tipul de paralizie hiperkalimică. În formele asociate cu mitotonie s-a pus în evidență o conductanță crescută la Na^+. La o potasemie crescută fibrele se depolarizează mai rapid și mai profund. Reducerea potențialului de membrană determină la început manifestările miotonice, iar cînd se atinge valoarea de —54 mV curentul de Na^+ este inactivat și apare paralizia. Fibrele normale expuse la aceeași

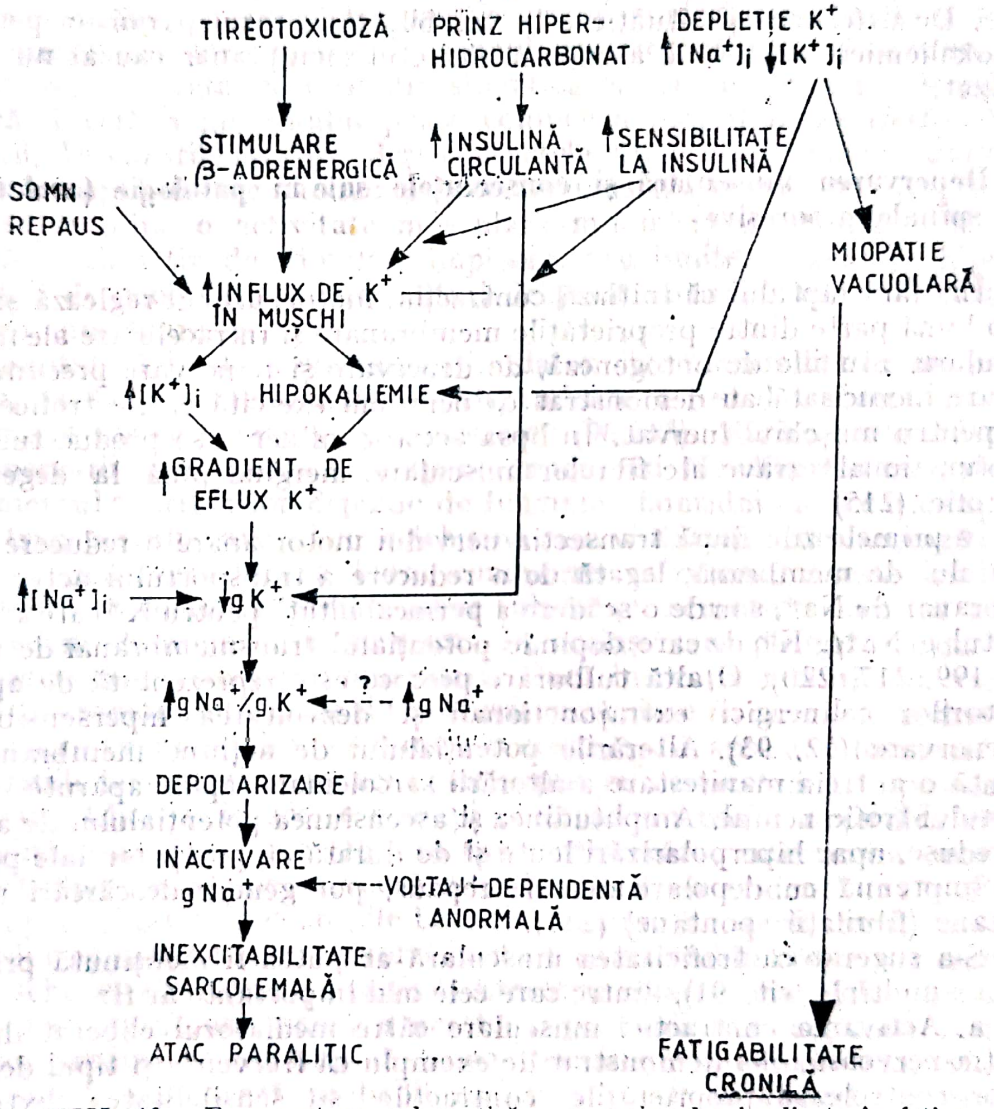


Fig. VIII. 13 — Reprezentarea schematică a mecanismelor implicate în fatigabilitatea cronică și atacul paralitic din paralizia periodică hipokaliemică.

concentrație de K^+ nu se depolarizează decît pînă la —70 mV, cînd nu apare decît cel mult activitatea de tip miotonic. Fibrele de la pacienți expuse *in vitro* la TTX nu mai ating pragul paralitic al depolarizării (131, 196). În formele de paralizie hiperkaliemică fără miotonie, mecanismul patogenetic pare a fi diferit. La aceeași hiperkaliemie fibrele acestor pacienți nu se depolarizează mai mult decît cele normale și sînt hiperexcitabile (cit. 131, 196).

Scanned with OKEN Scanner

Atacurile hiperkaliemice pot fi prevenite prin administrarea de hidroclortiazidă sau acetazolamidă care reduc potasemia (85). Stimularea pompei de $Na^+—K^+$ cu salbutamol (beta-adrenergic) ușurează atacurile. Gluconatul de calciu, blocînd probabil situsurile anionice de pe suprafața sarcolemei, ar menține gradientul electric transmembranar activînd conductanța pentru sodiu, în timp ce administrarea de glucoză cu insulină ar accentua influxul de K^+ în mușchi.

Datele prezentate nu permit susținerea unui mecanism patogenetic consistent al paraliziei hiperkaliemice. Raritatea cazurilor și a diferitelor variante clinice a împiedicat pînă în prezent realizarea unor cercetări susținute. De altfel aceeași situație este valabilă și în cazul paraliziei periodice normokaliemice, în care de asemenea defectul membranar cauzal nu a fost localizat.

2.5. Denervarea musculară și consecințele sale în patologie (amiotrofiile spinale progresive)

În afara faptului că inițiază contracția, motoneuronul reglează și menține o bună parte dintre proprietățile membranare și intracelulare ale fibrelor musculare. Studiile de ontogeneză, de denervare și reinervare precum și de inervare încrucișată au demonstrat că neuronul exercită efecte trofice esențiale pentru mușchiul inervat. În lipsa acestor influențe se produc tulburări morfofuncționale grave ale fibrelor musculare, mergînd pînă la degenerare și atrofie (215).

În primele zile după transecția nervului motor apare o reducere a potențialului de membrană, legată de o reducere a transportului activ transmembranar de Na^+, sau de o scădere a permeabilității pentru K^+ care ar altera raportul g Na^+/g K^+ de care depinde potențialul transmembranar de repaus (145, 199, 217, 220). O altă tulburare precoce este reprezentată de apariția receptorilor colinergici extrajoncționali și dezvoltarea hipersensibilității de denervare (52, 93). Alterările potențialului de acțiune membranar reprezintă o a treia manifestare a alterării sarcolemale rapide apărute în lipsa suportului trofic neural. Amplitudinea și ascensiunea potențialului de acțiune sînt reduse, apar hiperpolarizări lente și de durată cu postpotențiale pozitive care, împreună cu depolarizarea de repaus, pot genera descărcări ritmice spontane (fibrilații spontane) (217).

S-a sugerat că troficitatea musculară ar putea fi menținută prin mecanisme multiple (cit. 91), dintre care cele mai importante ar fi:

a. Activarea contracției musculare către mediatorul eliberat din terminația nervoasă. S-a demonstrat de exemplu că frecvența și tipul depolarizărilor controlează proprietățile contractile și sensibilitatea extrajoncțională la acetilcolină, precum și faptul că există un control transsinaptic al sintezei proteice și enzimatice exercitat de aceleași depolarizări (cit. 91,217).

b. Sinteza, transportul și eliberarea unor factori neurotrofici care exercită efecte trofice musculare independente de impulsurile nervoase.

c. Mecanisme musculare legate de activitatea contractilă și aflate probabil în relații de cooperativitate cu mecanismele precedente neurotrofice.

Mecanismele extraneurale care contribuie la dezvoltarea și menținerea proprietăților funcționale ale fibrelor musculare includ factori miogeni

primari, hormonali, vasomotori, umorali și periferici. Factorii miogeni primari (probabil informații genetice de origine musculară) acționează atît precît și postnatal. Sub acțiunea acestor factori se dezvoltă culturile de țesut muscular, se regenerează după degenerare completă mușchii transplantați, apar receptorii la acetilcolină și acetilcolinesterază pe mușchii embrionari *in vitro*. În cazul mușchilor transplantați, regenerarea nu necesită influențe neurale decît în ultimele stadii (27,91). Dintre influențele hormonale mai bine cunoscute sînt cele legate de acțiunea androgenilor, iar intervenția unor factori locali produși de celulele Schwann și alte celule gliale (acetil colină, factori de creștere) a fost de asemenea dovedită.

Mecanismele neurale prin care neuronul controlează funcția și troficitatea mușchiului inervat sînt în primul rînd reprezentate de acțiunea stimulatoare exercitată de mediația sinaptică asupra mușchiului. Stimularea cronică directă a mușchiului poate compensa parțial unele efecte ale denervării. În cazurile în care, deși contactele sinaptice se mențin, axonii nu descarcă impulsuri, se produc degenerări musculare care pot fi prevenite dacă se menține o activitate musculară minimă prin stimulare electrică directă. Același tip de stimulare împiedică sau limitează apariția hipersensibilității de denervare atît în culturi de țesut muscular cît și în cazul denervării musculare *in vitro*.

Faptul că, în afara efectului stimulator direct exercitat de mediatorul chimic, există și efecte neurotrofe independente, a fost demonstrat în cursul experimentelor de denervare și „disociere" (90,213). Manifestările musculare ale denervării apar înainte de a apărea modificări ale eliberării mediatorului și momentul apariției lor depinde de lungimea bontului nervos rămas. Blocarea transportului axonal cu colchicină sau vinblastină declanșează modificări de denervare fără a bloca conducerea nervoasă. Aceste observații pledează în favoarea existenței unor substanțe neurotrofe care ar acționa independent de impulsurile nervoase. În același sens pledează și datele de embriogeneză și reinervare musculară. Dacă inervația motorie nu este necesară în stadiile inițiale ale diferențierii musculare *in vitro*, ea devine esențială pentru supraviețuirea de durată și creștere. Sinapsele se formează chiar în condițiile blocajului permanent presinaptic cu hemicoliniu sau postsinaptic cu curara. Chiar și în aceste condiții prezența sinapselor împiedică apariția sensibilității de denervare (16). În cazul reinervării, intervenția unor substanțe trofice de origine nervoasă este de asemenea evidentă (117). Reinervarea apare chiar și în condițiile blocării eliberării de acetilcolină sau a receptorilor colinergici (33). Simplul contact cu axonul în creștere declanșează în mușchi efecte trofice pozitive. Eteroreinervarea mușchilor determină modificarea morfofuncțională a acestora, probabil, sub acțiunea factorilor specifici produși și eliberați de noua terminație nervoasă (83, 84, 149). Pericarionul sintetizează probabil mai mult decît o singură categorie de factori cu rol trofic (107,184). O parte, ajunși la nivelul terminației prin transport axonal, lent, sînt componente cu rol structural iar restul, adus prin transport axonal rapid, asigură întreținerea și creșterea terminației nervoase. O parte dintre acești factori au probabil rol miotrop și sînt transferați transsinaptic în teritoriul muscular (32, 91, 100). Macromolecule marcate din terminația nervoasă (stocate probabil în vezicule cu înveliș dens) au putut fi identificate în teritoriul muscular, unde ajung probabil prin procese succesive de exocitoză presinaptică și pinocitoză postsinaptică (77, 183).

Scanned with OKEN Scanner

Tabloul clinic și histopatologic de denervare musculară este întîlnit în numeroase afecțiuni neurologice caracterizate prin degenerescența neuronului motor. Din această categorie fac parte:

A. *Amiotrofiile spinale progresive* (forma infantilă Werdnig — Hoffmann; forma juvenilă Kugelberg-Wielander; forma Aran-Duchenne) caracterizate prin degenerări ale motoneuronului spinal de natură genetică sau virală, asociate uneori cu leziuni vasculare și traumatice.

B. *Atrofiile musculare* de natură, probabil, mixtă neurogenă dar și miogenă (distrofică), întîlnite de exemplu în sindromul scapulo-humeral.

C. *Scleroza leterală amiotrofică*, în care lezarea cu consecințe denervative a neuronului motor este însoțită de leziuni neuronale supraspinale exprimate clinic prin manifestări piramidale care adesea domină tabloul simptomatic.

D. *Sindromul artrogripotic*, în care leziunile denervative ale motoneuronului se însoțesc de distrofii musculare adesea progresive și dominante.

3. MECANISME MEMBRANARE ÎN PATOLOGIA SISTEMULUI NERVOS CENTRAL

Dacă în cazul patologiei, neuromusculare accesibilitatea structurilor implicate, posibilitățile de izolare și cercetare *in vitro* sau *in vivo* au permis acumularea unor date precise privind participarea membranelor în mecanismele patogenetice, în cazul afectării structurilor nervos centrale situația nu mai este aceeași. Deși datele acumulate indică fără dubiu intervenția membranelor neuronale în geneza și evoluția unor afecțiuni, natura precisă a acestor modificări, este, cu rare excepții, încă departe de a fi depășit stadiul ipotezelor și argumentelor indirecte. Din aceste motive în cele ce urmează vor fi subliniate doar aspecte disparate, dar relevante, cel puțin pentru acele afecțiuni și sindroame în care s-au înregistrat progrese în acest sens.

3.1. Implicațiile membranare ale hiperactivității neuronale

Descărcările neuronale excesive, sincrone și îndelungate a căror apariție paroxistică caracterizează criza epileptică, dar și alte stări paroxistice cerebrale, nu au deocamdată o explicație clară (34, 175). Numeroase date empirice privind acțiunile unor anticonvulsivante, precum și datele obținute prin modelele experimentale, par să indice faptul că în etiologia acestor descărcări membrana neuronală joacă un rol important prin mecanisme multiple (176).

Mecanisme de membrană în geneza epilepsiei

Manifestarea electrofiziologică neuronală primară este reprezentată atît în epilepsia umană cît și în modelele experimentale (cu penicilină, stricnină, cobalt, alumină, etc.) de apariția unei depolarizări paroxistice. Acest fapt a sugerat, încă de la observarea sa, posibilitatea existenței unui defect membranar primar, reflectat într-o permeabilitate alterată a neuronilor epileptogeni. Cum în perioadele interictale caracteristicile electrofiziologice ale membranei acelorași neuroni nu diferă față de normal, această ipoteză nu a putut

Scanned with OKEN Scanner

fi acceptată fără rezerve. O altă ipoteză patogenetică luată în discuție, dar abandonată astăzi aproape complet, este cea a intervenției unor mecanisme de transmitere efaptică electrogenă directă, care ar permite unei salve de stimuli generate de un neuron să cuprindă întreaga populație neuronală a focarului epileptic. O astfel de modalitate de transmitere pare a fi destul de rară în cazul neuronilor centrali. Singura posibilitate în acest sens ar putea fi reprezentată de o intervenție a celulelor gliale (176). Se consideră astăzi că geneza procesului epileptogen poate fi localizată la nivelul unor mecanisme neurochimice sinaptice. Nivelul normal de activitate a neuronilor centrali este consecința echilibrului stabilit între sinapsele excitatoare, care generează potențialele excitatoare postsinaptice (PEPS) și sinapsele inhibitoare, care generează potențiale inhibitoare (PIPS). Situate pre- sau postsinaptic, cele din urmă reduc frecvența de descărcare a PEPS blocînd, respectiv, fie conducerea fie membrana postsinaptică. Fără a intra în detalii ce depășesc cadrul celor de față, procesul pare astăzi a fi asociat unui deficit tranzitoriu al activității sinapselor inhibitoare, care, direct sau în prezența unor discrete creșteri ale activității excitatoare, permite descărcarea paroxistică din epilepsie. În mod evident fenomenul este de natură membranară și implică probabil intraneuronii inhibitori. În epilepsiile umane și unele modele experimentale s-a semnalat creșterea activității unor mediatori excitatori (acetilcolina, acidul glutamic etc.), precum și scăderea producerii și eliberării unor mediatori inhibitori (GABA, taurina, adenosina etc.). În geneza dezechilibrelor amintite au mai fost implicate alterări ale pompei de $Na^+ - K^+$ membranare cu efecte depolarizante, modificări ale echilibrului membranar dintre receptorii excitatori și inhibitori în favoarea celor din urmă (34, 175, 176). Faptul că în focarele epileptice s-a semnalat existența unor aspecte morfologice de deaferentare a determinat asocierea patogenetică a epilepsiei cu apariția hipersensibilității de denervare (237). Numeroasele ipoteze patogenetice enumerate, efortul considerabil depus, nu au permis însă nici pînă astăzi să se ajungă la o explicație definitivă a mecanismelor epilepsiei.

3.2. Demielinizările

Distrugerea tecii de mielină a axonilor creează condiții pentru apariția așa zisei conduceri efaptice, în care potențialul de acțiune al unui axon nu se mai transmite izolat spre sinapsa terminală ci determină apariția unor potențiale de acțiune în nervii învecinați. Aceste potențiale de acțiune ectopice orto- și antidromice realizează variate perturbări, atît ale informației ce ajunge la centrii de integrare din sistemul nervos central, cît și ale comenzilor consecutive. Ele pot reprezenta substratul numeroaselor manifestări comportamentale aberante ce apar în astfel de îmbolnăviri. Un model experimental deosebit de util este reprezentat în acest caz de șoarecele distrofic cu demielinizarea congenitală a rădăcinilor dorsale ale nervilor spinali (185). În clinica neurologică umană demielinizările apar în numeroase forme de îmbolnăvire de cauze diverse.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1. *Boli virale cu demielinizare*

Cum agresiunea virală la nivel membranar constituie obiectul unui alt capitol, cele de față se limitează la schițarea unei imagini generale. Invazia virală a unei celule presupune în primul rînd fixarea virusului competent la nivelul membranei celulare, etapă urmată ulterior de penetrare. Dacă fixarea virusului se realizează la nivelul unei componente membranare prezente la diverse clase de celule, atunci susceptibilitatea la virus este foarte largă. Dacă, dimpotrivă, locusul de fixare sau mecanismul de internalizare sînt caracteristice unei singure specii celulare, se poate vorbi de un tropism particular al virusului. Astfel se explică de exemplu existența virușilor „neurotropi" (110). În general virozele sistemului nervos central la om pot fi de 3 tipuri (110).

3.2.1.1. *Encefalita sau meningo-encefalita acută*

Encefalita sau meningoencefalita acută, exemplificată cel mai bine de infecțiile cu virus herpes simplex, cele mai frecvente viroze acute.

3.2.1.2. *Infecții virale lent progresive*

Infecții virale lent progresive, al căror reprezentant tipic este sindromul de panencefalită subacută sclerozantă, determinată probabil de un virus rubeolic modificat, sau leucoencefalopatia progresivă multifocală (cu virus papa. ra). Și în acest caz apar leziuni demielinizante întinse.

3.2.1.3. *Infecții virale lente* de tipul bolii Creutzfeld-Jakob sau kuru cu incubație de cîțiva ani, caracterizate anatomopatologic prin aspect de encefalopatie spongiformă.

3.2.2. *Boli autoimune cu demielinizare*

În această categorie de afecțiuni neurologice, aspectele etiopatogenetice sînt comune cu cele descrise în cazul miasteniei grave (a se vedea mai sus). Principalul mecanism patogenetic în aceste îmbolnăviri este atacul sistemului imunitar asupra țesutului nervos, cu răsunet important la nivel membranar. Din această categorie fac parte scleroza multiplă și sindromul Landry-Guillain-Barré.

3.2.2.1. *Scleroza multiplă*

Demielinizările ce apar în sistemul nervos central al pacienților cu această afecțiune sînt de origine indiscutabil imunitară, dar natura antigenului și explicația scăderilor sînt încă departe de a fi explicate. În această boală fascicule de axoni sînt denudați de învelișul mielinic. Conductibilitatea acestor fibre este puternic alterată. Fluxul de curent apărut la nivelul ultimului nod Ranvier intact este adesea incapabil să genereze potențialul de acțiune în zona denudată (234). Din acest motiv conducerea potențialului de acțiune este întîrziată sau blocată. Practic, toate manifestările clinice ale sclerozei multiple (astenie cu spasticitate, pierderi ale sensibilității, orbire, ataxie, tulburări comportamentale etc.) pot fi explicate prin acest mecanism.

Scanned with OKEN Scanner

Studiile histopatologice sînt cele care au adus primele dovezi în favoarea participării celulelor imunocompetente în patogenia sclerozei multiple. În vecinătatea regiunilor demielinizate apar celulele inflamatoare. In aceste infiltrate apar la început numai macrofage, ulterior intervenind limfocitele și plasmocitele. Reconstrucția leziunilor din secțiuni seriate a demonstrat forma generală de fus localizat perivenos. Studiile ultrastructurale au demonstrat că atacul primar se realizează la nivelul oligodendrocitelor, celule răspunzătoare de mielinizarea sistemului nervos central (208). Se produc concomitent demielinizări din ce în ce mai puțin accentuate dinspre centrul spre periferia leziunii, axonii și astrocitele rămînînd aparent normali. Dintre aspectele mai reprezentative privind participarea sistemului imun în geneza sclerozei multiple trebuie menționată în primul rînd incidența mult crescută a complexelor antigenice majore de histocompatibilitate A3, B7 și DW2 la pacienții astfel diagnosticați (235). Este posibil ca sistemul imun al persoanelor din această categorie să fie mai apt în a genera atacuri autoimune la anumite antigene normale. O explicație alternativă ar fi cea conform căreia la astfel de persoane răspunsul imun la unele infecții virale ar putea avea componente capabile să acționeze prin imunitate încrucișată la nivelul mielinei. Existența componentei imune în patogenia sclerozei multiple este demonstrată și de creșterea mare a imunoglobulinelor în lichidul cefalorahidian. Deși s-a demonstrat originea nervos centrală autohtonă a acestor anticorpi, studiul lor nu a permis identificarea unui antigen constant specific (235).

Cercetarea limfocitelor imunocompetente din circulația pacienților cu scleroză multiplă a evidențiat existența unor modificări. Proporția de limfocite T supresoare scade semnificativ la pacienți în perioadele de exacerbare a sclerozei multiple (188).

În ciuda unor eforturi considerabile nu s-a putut evidenția pînă în prezent antigenul răspunzător de declanșarea atacului imun din scleroza multiplă. Deși la un moment dat posibilitatea implicării unui virus persistent în patogenia bolii părea probabilă, izolarea unui astfel de agent la pacienții cu scleroză multiplă nu a putut fi realizată. Nu a fost posibilă de altfel nici realizarea unui model experimental al bolii cu un agent viral specific. Din aceste motive cercetările recente s-au concentrat pe posibilitatea găsirii unui antigen specific în rîndul componentelor normale ale mielinei. Este posibil ca proteina bazică a mielinei să reprezinte ținta atacului imun (238). Această proteină sau fragmente apar în lichidul cefalorahidian al pacienților cu scleroză multiplă, dar și cu alte afecțiuni demielinizante. S-au detectat, la majoritatea pacienților cu scleroză multiplă, anticorpi specifici proteinei bazice, dar și pentru alte componente ale mielinei. Nu s-a putut preciza caracterul primar sau secundar al acestui proces. La animale s-a obținut așa-zisa „encefalită autoimună experimentală" prin injectare de mielină sau componente ale mielinei. Modelul experimental astfel obținut se caracterizează prin leziuni extinse de demielinizare. Cercetările în curs sînt deosebit de active.

3.2.2.2. *Sindromul Landry-Guillain-Barré*

Caracterizat clinic printr-o astenie cu evoluție rapidă, sindromul este atribuit unui proces de demielinizare a nervilor periferici. În zonele lezate se produce degenerarea celulelor Schwann, asociată cu o acumulare semnifica-

Scanned with OKEN Scanner

tivă de limfocite, macrofage și plasmocite. Un model experimental al bolii (nevrita autoalergică experimentală) s-a obținut prin imunizare cu mielină autologă sau cu fragmente proteice izolate din mielină. Datele clinice și experimentale pledează în favoarea intervenției unui atac autoimun îndreptat împotriva unei componente membranare insuficient precizată pînă astăzi.

3.3. Boli asociate cu defecte membranare de natură metabolică

În această categorie pot fi incluse o serie de tulburări congenitale, nu foarte frecvente dar bine studiate, ce implică acumularea unor lipide membranare sau incapacitatea de a genera anumite componente ale membranei normale. Ele apar de obicei în contextul unui defect enzimatic care fie că blochează sinteza unei componente membranare fie că determină acumularea unor substrate ce apar în membrană și alterează proprietățile sale sau afectează metabolismul intracelular (211). Ele nu vor fi descrise decît sumar în cele ce urmează.

3.3.1. *Sindromul Niemann-Pick*

Transmisă autosomal recesiv, tulburarea este determinată de un deficit de sfingomielinază cu acumulare anormală de sfingomielină în neuroni. S-au identificat 5 forme clinice distincte. Tipul A debutează în copilărie și se caracterizează printr-o degenerescență progresivă a SNC fatală în cîțiva ani. Tipul C debutează mai lent și are o evoluție de 10—15 ani cu degradare neurologică, treptată, convulsii și sfîrșit letal.

3.3.2. *Boala Gaucher*

Transmisă de asemenea autosomal recesiv, boala Gaucher este un defect de beta-glicozidază care determină acumularea de glucocerebrozide în celulele reticulo-endoteliale din ficat, splină și măduva osoasă. S-au descris 3 tipuri clinice: — *tipul 1* este o formă relativă ușoară, compatibilă cu supraviețuirea pînă la vîrste adulte și tulburări neurologice discrete. Glucocerebrozidaza este scăzută la 12—45% din normal; — *tipul 2* se caracterizează prin severitatea lezării nervos centrale, evidentă de obicei din luna a 6-a de viață. Enzima este practic absentă; — *tipul 3* devine evident în copilărie sau la adult. manifestrîndu-se prin convulsii sau deficit intelectual progresiv. Deficitul enzimatic are valori intermediare între tipul 1 și 2.

În general se consideră că acumularea de gangliozide în neuron este mai evidentă (ca și leziunile) în cursul dezvoltării, cînd gangliozidele au rată metabolică crescută.

3.3.3. Boala Kraabe

Determinată de deficitul galactocerebrozid-beta-galactozidazei transmis autosomal recesiv, boala se caracterizează prin acumularea de celule globoide în diverse regiuni ale sistemului nervos central. Astfel de celule au putut fi induse experimental prin depunerea locală de galactocerebrozide.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.4. *Boala Fabry*

Sindromul este o tulburare de tip X caracterizată prin atacuri de durere acută, manifestări de neuropatie periferică moderată (disestezii) și tulburări vegetative moderate (capacitate sudorală redusă). Se produc pierderi selective ale axonilor subțiri mielinizați sau nu din sistemul nervos periferic. Este vorba despre un deficit de alfa-glucozidază cu acumulări de globoside și ceramidetrihexoside.

3.3.5. *Gangliozidozele*

În creierul uman există 10 gangliozide diferite și s-au descris 5 tipuri de alterări autosomal recesive ale metabolismului acestor compuși. Cea mai bine cunoscută este cea din boala Tay-Sachs, determinată de deficitul de hexosaminidază A. Tulburarea, cunoscută și sub denumirea de gangliozidoză GM2, este evidentă în copilărie, se caracterizează prin acumularea neuronală de lipide și determină moartea în cîțiva ani. În lipsa ambelor hexozaminidaze (A și B) apare boala Sandhoff-Jatzkewitz de asemenea rapidă și cu deznodămînt fatal.

3.3.6. *Leucodistrofia metacromatică*

Această tulburare autosomal recesivă afectează în special oligodendrocitele formatoare de mielină, precum și celulele Schwann. Clinic este caracterizată prin tulburări variate mergînd de la o degenerescență acută a sistemului nervos central la copii, pînă la o constelație de neuropatii periferice și demență la adulți. Deficitul de arylsulfatază A cu acumularea de sulfatide par a determina leziunile celulare printr-un mecanism încă necunoscut.

3.4. Boala Huntington

Deși este încă departe de a fi dovedită, participarea eventuală a unui defect membranar în etiopatogenia bolii Huntington pare a fi tot mai probabilă. De natură autosomal recesivă, această boală cu evoluție progresivă și fatală este catacterizată în principal prin apariția tulburărilor motorii extrapiramidale și demență. Leziunile neuronale distructive sînt deosebit de extinse în caudat și putamen. Într-un efort de a se elucida patogenia bolii s-a căutat expresia genei aberante în alte specii celulare și mai ales la fibroblaști cultivați și hematii.

Cercetările pe fibroblaști cultivați *in vitro* au demonstrat că, în cazul celulelor prelevate de la pacienți cu boala Huntington compoziția membranei este diferită de cea a fibroblaștilor normali fără a putea preciza în detaliu natura acestor diferențe. (172). Alte cercetări au demonstrat că rețeaua filamentelor de actină din aceste celule este identică la pacienți și normali (76).

În cazul hematiilor prelevate de la pacienți, cercetările de rezonanță electronică de spin au sugerat existența unor alterări ale stării fizice a proteinelor membranare (24). Aspectul eritrocitelor de la pacienți este anormal iar ATP-aza ($Na^+—K^+$) membranară are activități crescute (8, 150). Studii de spectroscopie în fluorescență au evidențiat modificări ale mobilității rotaționale a marcherilor fluorescenți, sugerînd existența unor defecte pe ambele fețe ale membranei fără a putea preciza natura exactă a acestora (8, 173). Rezultatele acestor cercetări sînt încă departe de a fi definitive.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie

1. ABHOLD R. H., HEGREBERG G. A., MAGNUSON J. A. — Amer. J. Hematol., 15, 1983, 15.
2. ALBUQUERQUE E. X, RASH J. E., MAYER R. F., SATTERFIELD J. R.—Exp. Neurol. 1976, 51, 536.
3. ALEMA D., CULL-CANDY S. G., MILEDI R., TRAUTMANN A. — J. Physiol (Lond.) 1981, 311, 251.
4. ALKHADI K. A., McISAAC R. J. — Arch. Int. Pharmacodyn. Thér. 1978, 232, 58.
5. ALMON R. R., ANDREW C. G., APPEL S. H. — Science, 1974, 186, 55.
6. ANDERSON D., BLOBEL G. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1983, 48, 135.
7. APPEL S. H., ELIAS S. B., CHAUVIN P. — Fed. Proc. 1979, 38, 2381.
8. APPEL S. H. — Adv. Neurol. 1979, 23, 387.
9. ASHRAF J., FEIX J. B., BUTTERFIELD D. A. — Biosci. Rep., 1984, 4, 115.
10. AUSTIN L., DENIESE M., JEFFREY P. L. — *in New Approaches to Nerve and Muscle Disorders* (sub red. Kidman A. D., Tomkins J. K., Westerman R. A.) — Excerpta Med. Elsevier N. Hollan, 1981, 388.
11. BEVAN S., STEINBACH J. H. — J. Physiol (Lond.), 1977, 267, 195.
12. BEYER P., STEPHAN M., OBERLING F., DEYA Y. — La Nouv. Presse Méd. 1977, 6, 1663.
13. BLANLOEIL Y., BARON D., GAZEAU M. F., NICOLAS F. — Anesth. Anal. Réan, 1980, 37, 441.
14. BLANLOEIL Y., BARON D., NICOLAS F. — La Nouv. Presse Méd. 1980, 9, 48.
15. BOGEN S., MOZES E., FUCHS S. — J. Exp. Med. 1984, 159, 292.
16. BRAITH WAITE A. W., HARRIS A. J. — Nature, 1979, 279, 549.
17. BRĂNIȘTEANU D. D., PROCA B., ZAIM R., BRĂNIȘTEANU G., VOLLE R. L. — Rev. Med. - Chir., 1978, 82, 437.
18. BRĂNIȘTEANU D. D., PROCA B., HAULICĂ I. D. — J. Pharmacol. Exp. Therap. 1979, 209, 31.
19. BRĂNIȘTEANU D. D., SAUCIUC AL., PROCA B., FUICĂ A., GOGESCU G. — Rev. Med.—Chir., 1982, 86, 287.
20. BRYANT S. H. — in *New Developments in EMG and Clinical Neurophysiology*. (sub red. Desmedt J. E.). Karger Basel 1973, 420.
21. BRYANT S. H. — in *Disorders of the Motor Unit (sub red. Schotland D. L., Wiley N. Y.)*, John Wiley et Sons, New York, 1982, p. 381.
22. BURGEN A. S. V. — in *Neuromuscular Blocking and Stimulating Agents — (sub red. Radouco-Thomas C.)*, Pergamon Press (IUPHAR) 1973, 1, 169.
23. BUTTERFIELD A. D., MARKESBERY W. R. — J. Neurol. Sci. 1980, 47, 261.
24. BUTTERFIELD A. D., OESWEIN J. Q., MARKESBERY W. R. — Nature (Lond.) 1977, 267, 453.
25. CAMPBELL H., BRAMWELL E. — Brain, 1900, 23, 277.
26. CAMPION D. S., PETER J. B. — Neurology 1974, 24, 393.
27. CARLSON B. M., GUTMANN E. — Exp. Neurol. 1976, 53, 82.
28. CARTLEMAN B. — Ann. N. Y. — Acad. Sci. 1966, 135, 496.
29. CHALIKIAN D. M., BARCHI R. L. — Neurol. 1980, 30, 277.
30. CHANG C. C., LEE C. Y. — Br. J. Pharmacol. Chemother. 1966, 28, 172.
31. CHANG H. W., BOCK E. — Biochemistry, 1977, 16, 4513.
32. CHIAPINELLI V., GIACOBINI E., PILAR G., UCHIMURA H. — J. Physiol. (Lond.) 1976, 257, 749.
33. CHIU T. H., LAPA A. J., BARNARD E. A., ALBUQUERQUE E. X. — Exp. Neurol. 1974, 43, 399.
34. CIUCĂ I., DIMITRIU R., ȘERBĂNESCU A., APOSTOL V., FLORESCU D. — *în Tratat de Neurologie* (sub red. Arseni C.), Ed. Med. București, 1980, 2, 392.
35. CLAUDIO T., RAFTERY M. A. — J. Supramol. Struct, 1980, 14, 267.
36. CLEMENTI F., SHER E. — Eur. J. Cell Biol. 1985, 37, 220.
37. COHEN S. A., PIMPLIN D. W. — J. Cell-Biol. 1979, 82, 494.
38. COMPSTON D., VINCENT A., NEWSOME-DAVIS J., BATCHELAR J. — Brain, 1981, 103, 579.
39. CONTI-TROUCANI B. M. — Ann. Rev. Biochem. 1982, 51, 491.

Scanned with OKEN Scanner

198. SAITOH T., CHANGEUX J. P. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 4430.
199. SAKMANN B., BRENNER H. R. — Nature, 1978, 276, 401.
200. SANDRINI G., BOTTIROLI G., NAPPI G., BALDUINI C., BROVELLI A. — Acta neurol. scand., 1982, 65, 661.
201. SARGENT P., HEDGES B., TSAVALER L., CLEMMONS L., TZARTOS S., LINDSTROM J. — J. Cell. Biol., 1983, 98, 609.
202. SATYAMURTI S., DRACHMAN D. B., SLONE F. — Science, 1975, 187, 955.
203. SCARLATO G., MEOLA C., SILANI V., MONFREDI L., BOTTIROLI G., ZAMELLA A. — Acta Neurol. Scand., 1979, 59, 262.
204. SCGIMMEL S. D., GOFF R. — Muscle-Nerve, 1980, 3, 417.
205. SEYBOLD M., LINDSTROM J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1981, 377, 292.
206. SHAW J. M., HENRY J. E., SHAW K. V. KONIGSBERG I. R. — Biochem. Biophys. Acta, 1983, 733, 1.
207. SHIBUYA N., MORI K., NAKAZAWA Y. — Neurology, 1978, 28, 804.
208. SILBERBERG D. H. — in *Scientific Approaches to Clinical Neurology* (sub red. Goldensohn E. S., Appel S. H.), Lea and Febriger Publ. Co. Philadelphia, 1977, p. 298.
209. SIMPSON J. — Scott. Med. J., 1960, 5, 419.
210. SINE S., STEINBACH J. — Biophys. J., 1984, 45, 175.
211. STANBURY J. B., WYNGAARDEN J. B., FREDRICKSON D. S. — *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill N. Y., 1978.
212. STATHAM H. E., DUBOWITZ V. — Clin. Chim. Acta, 1979, 96, 225.
213. STEVENS W. F., HOOISMA J., SLAAF D. W., MEETER E. — in: *Maturation of the Nervous System* (sub red. *Corner MA*) Elsevier/Nort Holland Biomed. Press, 1979, p. 31.
214. SZIBOR R., STEINBICKER V., REDMANN K., HEUSE E. — Clin. Genetics, 1979, 15, 475.
215. TACHIKAWA T., CLEMENTI F. — Neurosci., 1979, 4, 437.
216. TARRAB-HAZDAI R., AKARONOV A., SILMAN I., FUCHS S. — Nature, 1975, 256, 128.
217. THESLEFF S. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, 128, 89.
218. TINDALL R. S. A. — Neurology, 1980, 30, 554.
219. TOFFELMIRE E. B., BOEGMAN R. J. — Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1980, 58, 1245.
220. TRENDELENBURG U. — in: *Receptors for Neurotransmitter and Peptide Hormones* (sub red. Pepeu G., Kuhar M. J., Enna S. Y.), Raven Press N. Y., 1980, p. 99.
221. TRIGGLE D. J. — TIPS, 1980, oct., 395.
222. TSUCHIYA Y., SUGITA H., KUROIWA Y. — Biochem. Med., 1983, 30, 271.
223. TZARTOS S., LINDSTROM J. M. — Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1980, 77, 755.
224. TZARTOS S., SEYBOLD M., LINDSTROM J. M. — Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1981, 79, 188.
225. VICKERS J. D., MC COMAS A. J., RATHBONE M. P. — J. Canad. Sci. Neurol., 1978, 5, 437.
226. VINCENT A. — TINS 1983, July, 249.
227. VINCENT A., CULL-CANDY D., NEWSOME-DAVIS J., TRAUTMANN A., MOLENAAR O., POLAK R. — Muscle-nerve, 1981, 4, 306.
228. VINCENT A., NEWSOME-DAVIS J. — Clin. Exp. Immunol., 1982, 49, 266.
229. VINCENT A., NEWSOME-DAVIS J. — Clin. Exp. Immunol., 1982, 49, 257.
230. WACHOLTZ M. C., RAIBLE D. G., JACKOWSKI S., RODAN S. B., RODAN G. A., SHA'AFI R. I. — Clin. Chim. Acta, 1979, 96, 255.
231. WAKAYAMA Y., HODSON A., BONILLA E., PLEASURE D., SCHOTLAND D. L. — Neurology, 1979, 29, 670.
232. WALKER M. B. — Lancet, 1934, 1, 1200.
233. WALTON J. N., GARDNER-MEDWIN D. — in: *Disorders of Voluntary Muscle* (sub red. *Walton*), J. Churchill Livingstone Publ. Co. Edinburgh, 1981, p. 481.
234. WAXMAN S. G. — Arch. Neurol., 1977, 34, 585.

Scanned with OKEN Scanner

IX. Rolul membranelor biologice în procesele de îmbătrînire

„Fenomenele ce însoțesc bătrînețea, ca și acelea ce o determină, sînt așa de numeroase și de complexe, iar mecanismul producerii lor așa de interesant de cercetat, încît e imposibil ca ele să nu se impună atenției oricărui biolog adevărat. E vorba de biologia vîrstelor, sau precum am propus mai demult a fi numită, ilikibiologia *(de la ilikis = vîsrtă). Ilikibiologia va trebui să studieze variațiile morfologice , chimice, fizice și fiziologice ale ființelor vii în raport cu vîrsta și să afle determinismul acestor variațiuni".*

C. I. PARHON (1955)

Prezența acestui subiect într-o lucrare referitoare la relația biomembrane-patologie poate resuscita o veche dispută: dacă bătrînețea este un proces fiziologic sau, dimpotrivă, patologic. Pentru ambele alternative există argumente și contraargumente, o certitudine fiind receptivitatea crescută la boli în această perioadă a vieții omului, prelungită tot mai mult în ultimele decenii. Îmbătrînirea însă trebuie să constituie obiect al cercetării fundamentale și aplicate clinice, așa cum a demonstrat-o strălucit școala românească de gerontologie și geriatrie prin contribuțiile consacrate pe plan internațional ale lui Gh. Marinescu, C. I. Parhon și ale acad. Ana Aslan (4, 92, 105).

Profesorii Gh. Marinescu și C. I. Parhon pot fi considerați printre întemeietorii pe plan mondial ai gerontologiei (107). Lucrările publicate de Gh. Marinescu asupra modificărilor structurale ale neuronului în îmbătrînire și asupra plăcilor senile rămîn, în mod surprinzător, deosebit de actuale.

Bazele moleculare ale numeroaselor modificări produse funcție de vîrsta organismului sînt doar în curs de explicare. Totuși, unul dintre mecanismele care contribuie la aceste modificări extrem de diverse decurge din alterarea compoziției membranei celulare și ale proprietăților sale biofizice, care sînt asociate cu procesele de îmbătrînire. Este extrem de semnificativ faptul că alterările biomembranelor sînt adesea specifice și implică transportul de ioni, recunoașterea și transducția semnalelor, precum și reglarea activităților enzimatice. O serie de lucrări recente exprimă două tendințe principale: pe de o parte, conturarea unei „teorii de membrană" ca un mecanism de bază în producerea senescenței și, pe de altă parte, detectarea unor biomarcheri la nivelul membranei cu ajutorul cărora să fie detectată și eventual cuantificată evoluția procesului de îmbătrînire (15, 26, 27, 36, 39, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 99, 118, 154).

1. TEORII ASUPRA PROCESULUI DE ÎMBĂTRÎNIRE

Asemenea oricărui fenomen biologic încă neelucidat, în explicarea proceselor de îmbătrînire coexistă o serie de teorii care, sintetic, pot fi clasificate funcție de factorii considerați primordiali, astfel: a) teorii bazate pe modifică-

Scanned with OKEN Scanner

rile celulare; b) teorii ale modificării organelor; c) teorii populaționale; d) teoriile „meta-îmbătrînirii" (51, 52).

a) *Teoriile celulare*, relevă importanța potențialului poliferativ inerent limitat al celulelor, considerînd că animalele nu pot „fugi în afara celulelor" odată ce acest potențial a fost epuizat. Ideea nu este nouă, dar în prezent coexistența mai multor teorii celulare conduce la ceea ce se numește citogerontologie.

Cea mai importantă teorie celulară, formulată de I. Szilard, atribuie senescența mutațiilor genetice intervenite la nivelul cromozomilor și avînd drept consecință sinteza de proteine cu o structură alterată (146). Autorul a dezvoltat chiar o formulare matematică pornind de la observații accesibile, indicatoare ale programării genetice a procesului de îmbătrînire: fiecare specie are o longevitate caracteristică, există o diferență funcție de sex, gemenii au o durată de supraviețuire similară, iar durata vieții se reduce după mutații spontane sau declanșate experimental. Ulterior, prin extinderea cercetărilor la scară moleculară argumentele s-au multiplicat, culminînd cu ipoteza existenței unor gene responsabile de procesul de îmbătrînire sau chiar „gene ale morții celulare", ori „sinucigașe". În realitate, însă, rolul mutațiilor genetice în îmbătrînire este relativ redus, deoarece anomaliile genetice prin mutație pot rămîne fără efect în organele cu regenerare activă. Liniile celulare cele mai viguroase rezistă la acest fenomen prin selecție (67). Pe de altă parte, la populațiile celulare îmbătrînite s-a constatat o masivă inactivare a enzimelor (minimum 25%), care ar necesita un număr extrem de crescut de mutații, incompatibile cu supraviețuirea (61, 62).

O altă teorie, emisă de L. E. Orgel, localizează cauzele senescenței la nivelul citoplasmei, procesul rezultînd din deficiența funcțională a enzimelor ce catalizează diverse etape ale sintezei proteinelor. La celulele normale aceste deficiențe sînt rare, iar moleculele alterate „se diluează" în masa de molecule normale. Acumularea progresivă a enzimelor cu activitate catalitică diminuată conduce la „o catastrofă a erorilor" în sinteza proteinelor, provocînd moartea celulară (103). Mai multe fapte experimentale susțin această teorie: detectarea unor anomalii ale enzimelor protoplasmatice implicate în sinteza proteinelor, acumularea de enzime inactive funcție de vîrstă, precum și efectele unor analogi de aminoacizi și baze azotate componente ale acizilor nucleici asupra longevității. Ultimele experimente sînt interesante: analogii de baze azotate (de exemplu, 5-fluorouracil) provoacă formarea de tripleți inactivi în acizii nucleici, iar analogii de aminoacizi (de exemplu, DL-fluorofenilalanina, DL-etionina, DL-selenometionina) pot fi incluși în lanțul polipeptidic al proteinelor enzimatice, diminuînd activitatea acestora. Ca urmare, utilizarea de analogi a determinat scurtarea semnificativă a duratei de viață la drosofila, șoarece, fibroblaste de om în cultură și la pseudopora (62, 67).

În realitate, cele două teorii menționate nu se exclud, în plus există argumente că ele nu pot explica întru totul modificările moleculare din îmbătrînire. Argumentul cel mai puternic este furnizat de modificările structurale și funcționale ale enzimelor survenite după sinteză, Tipul celular preferat pentru cercetarea acestui aspect îl reprezintă eritrocitele de mamifere, care, așa cum se știe, au o supraviețuire fiziologică determinată (120 zile la om) și sînt incapabile să sintetizeze proteine. Ori, numeroși autori au constatat modificări ale structurii chimice, termolabilității și comportamentului cinetic al mai multor enzime la nivelul globulului roșu senescent. Din multiplele date

Scanned with OKEN Scanner

experimentale menționăm doar alterările glucoză-6-fosfat dehidrogenazei, dehidrogenazei acidului lactic, piruvatchinazei, fructoză-1-6-difosfat aldolazei care, împreună cu multe alte modificări similare, se constituie în generarea unui autentic declin metabolic (36, 70, 89, 90, 98, 108, 138). Pe măsura acumulării datelor s-a constatat că dispariția zilnică la adult a celor 2×10^{11} eritrocite, echivalînd cu 40 ml sînge este un fenomen mai complex. S-a invocat, de aceea, descreșterea sarcinii de suprafață a celulei ca urmarea reducerii acidului sialic, fenomen care conduce la alterarea glicoproteinelor membranei (8, 13) prezența unui antigen specific senescenței cu masa de aproximativ 210.000 d, modificări ale fosforilării la nivelul membranei (78), creșterea permeabilității pasive pentru K^+ (7, 68), descreșterea captării fierului (95), reducerea deformabilității (145), toate aceste modificări pledînd în favoarea teoriei de membrană a proceselor de îmbătrînire, asupra căreia vom reveni.

Neîndoielnic, teoriile celulare domină cercetările de biologie moleculară a senescenței (Fig. 1).

b) *Teoriile modificării organelor* pot fi racordate la primele, deoarece țesuturile și organele reprezintă confederații de celule, totuși în cadrul procesului de îmbătrînire există modificări specifice acestui nivel de organizare. Este cazul, în primul rînd al complexului major de histocompatibilitate care prezintă modificări asociate cu vîrsta (152). De fapt, prin acest grup de teorii conturat recent se trece pe primul plan sistemul imunitar al organismului, dar datele actuale nu sînt suficiente pentru a le conferi o coerență.

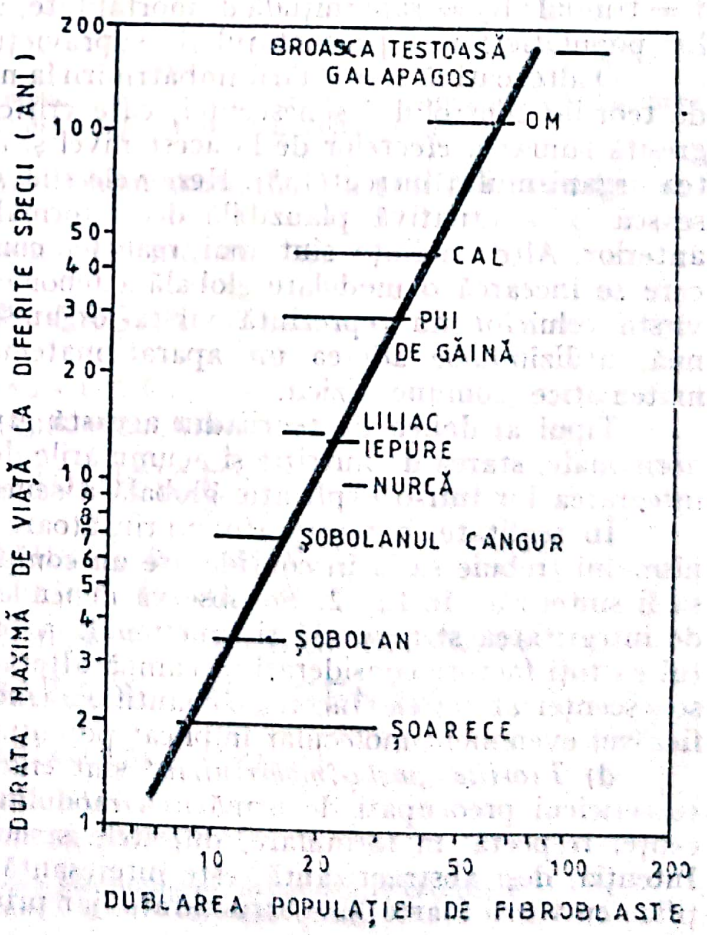


Fig. IX. 1 — Un experiment foarte cunoscut, realizat de L. Hayflick: fibroblastele animalelor tinere provenind de la 10 specii diferite se multiplică în cultură riguros proporțional cu durata maximă a vieții speciilor respective. De aici concluzia existenței unui „cronometru" intranuclear al controlului senescenței și duratei de viață (După L. Hayflick 1984) (56).

Scanned with OKEN Scanner

Deocamdată se consideră că integritatea proceselor imunologice reprezintă mai curînd un sistem antiîmbătrînire, decît o cauză în sine. În afară de aceasta, caracteristicile imunologice depind în cea mai mare măsură de integritatea suprafeței celulare, ceea ce înseamnă o reîntoarcere la biomembrane și structurile asociate acestora.

c) *Teoriile populaționale* au fost divizate în două tipuri (52). Primul tip corelează longevitatea cu antioxidanții, susținînd drept determinant al duratei de viață controlul homeostatic al antioxidanților din organism. Aceasta înseamnă de fapt, o reluare a teoriei rolului radicalilor liberi (49, 51, 52). Patologia radicalilor liberi rezultă din reacțiile radicalice necontrolate, care încep la nivel molecular cu peroxidarea lipidelor, avînd drept consecință lezarea biomembranelor (156). Iată o nouă sugestie pentru teoria de membrană. S-a demonstrat, că antioxidanții determină la șoarece creșterea duratei medii a vieții, diminuarea masei corporale și tendința de atingere a duratei medii de viață (28). R. G. Cutler, principalul susținător al acestei teorii, calculează pornind de la nivelul antioxidanților din diferite organisme ceea ce denumește „potențialul duratei medii de viață" (28). Pentru om el stabilește durata, discutabilă de 90 ani, pentru urangutan 50, utilizînd în calcule următoarea ecuație:

$$n = n_0 \exp \{(R_0/a)\ (1 - \exp\ [a \cdot t])\}$$

unde a = constanta Gompertz, o constantă de specie cu valori între 2 și 12 stabilită în funcție de durata maximă de viață realizabilă a speciei respective; t = timpul; R_0 = rata inițială de mortalitate; n_0 = numărul inițial al membrilor populației; n = procentajul de supraviețuitori în raport cu n_0.

O alternativă a evaluării îmbătrînirii la nivel populațional este conturată de teoriile controlului senescenței, care critică teoriile celulare, considerînd greșită sumarea efectelor de la acest nivel și extrapolarea lor la complexitatea organismului întreg (155). Rezervele sînt valabile, rămîne însă să se găsească o alternativă plauzibilă decît formalismul relativ prezentat sumar anterior. Alte tendințe sînt mai realiste, considerînd limitate teoriile prin care se încearcă o modelare globală a fenomenelor de senescență, chiar dacă vîrsta celulelor nu reprezintă vîrsta organismului (31). Cercetările continuă, utilizîndu-se adesea un aparat matematic complex, inclusiv metode matematice comune fizicii.

Tipul al doilea de teorii din această grupă ia în considerare variațiile hormonale, starea de nutriție și acumulările de modificări ale ADN, încercînd integrarea lor într-o explicație globală a senescenței (113).

În realitate, o teorie atotcuprinzătoare a îmbătrînirii la nivelul organismului trebuie să ia în considerare un complex de factori pe care încercăm să îi sintetizăm în fig. 2. Se observă dependența factorilor notați cu 6—11 de integritatea structurală și funcțională a biomembranelor, precum și faptul că toți factorii considerați înseamnă alterări la nivel celular. Teoreticienii senescenței ar putea încerca o cuantificare, în realitate extrem de dificilă, a fiecărui eveniment molecular implicat potențial în îmbătrînirea organismului.

d) *Teoriile „meta-îmbătrînirii"* sînt emergente din preocupările unor teoreticieni preocupați de urmărirea modului în care teoriile asupra senescenței respectă, în formulare, diferitele structuri teoretice din alte științe. Intenția, deși abstractizantă, este interesantă deoarece există domenii științifice cu teorii foarte bine structurate, iar prin analogie și extrapolări se pot

Scanned with OKEN Scanner

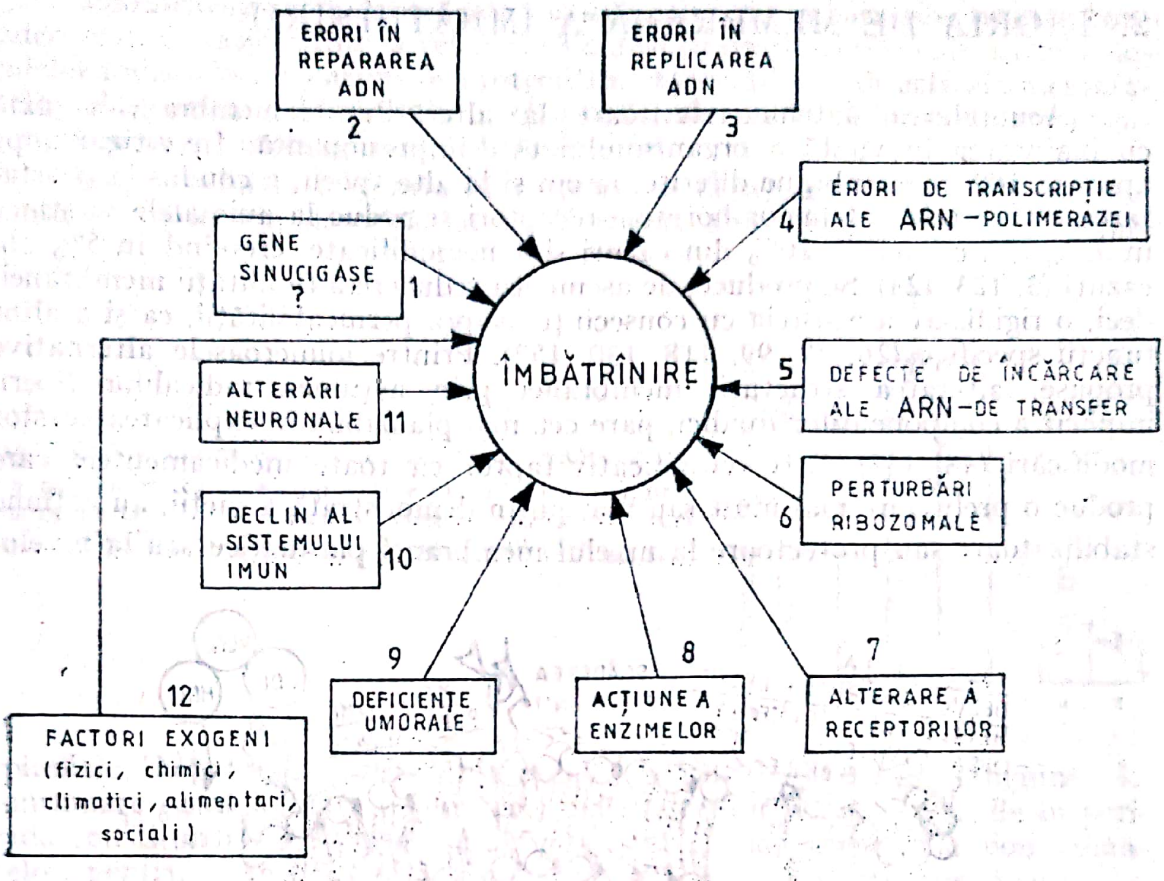


Fig. IX. 2 — Rețeaua evenimentelor moleculare care pot contribui potențial la îmbătrînire (cauzele notate cu 6—11 depind de integritatea biomembranelor).

obține unele rezultate în sesizarea punctelor slabe ale teoriilor actuale referitoare la senescență.

Prezentăm și o clasificare mai recentă (fig. 3).

I TEORII DE ORGAN:

1 - TEORIA IMUNOLOGICĂ.
2 - TEORIA NEUROENDOCRINĂ.

II. TEORII FIZIOLOGICE:

1 - TEORIA RADICALILOR LIBERI.
2 - TEORIA „LEGĂRII ÎNCRUCIȘATE".
3 - TEORIA ACUMULĂRII DEȘEURILOR METABOLICE.

III. TEORII BAZATE PE GENOM:

1 - TEORIA MUTAȚIILOR SOMATICE.
2 - TEORIA ERORILOR.
3 - TEORIA PROGRAMĂRII.

Fig. IX. 3 — Teorii asupra mecanismelor îmbătrînirii; clasificare recentă efectuată de L. Hayflick (1985).

Scanned with OKEN Scanner

2. TEORIA DE MEMBRANĂ A ÎMBĂTRÎNIRII

Acumularea datelor referitoare la alterările biomembranelor odată cu înaintarea în vîrstă a organismului este impresionantă. Investigarea pe aproape 100 de membrane diferite, la om și la alte specii, a condus la constatarea că efectele sistemelor hormoni-receptori se reduc la animalele virstnice în 75% din cazuri, în 20% din cazuri sînt nemodificate, crescînd în 5% din cazuri (3, 123, 124). Se produce, de asemenea reducere a fluidității membranei, deci, o rigidizare a acesteia cu consecințe asupra permeabilității, ca și a altor funcții specifice (26, 59, 99, 118, 130, 157). Printre numeroasele alternative propuse, alterarea structurii membranei prin acțiunea radicalilor liberi, implicit a componenților lipidici, pare cea mai plauzibilă în explicarea acestor modificări (48, 132). Este semnificativ faptul că toate medicamentele care produc o prelungire mai mult sau mai puțin demonstrată a vieții, au acțiune stabilizatoare sau protectoare la nivelul membranei plasmatice sau la nivelul

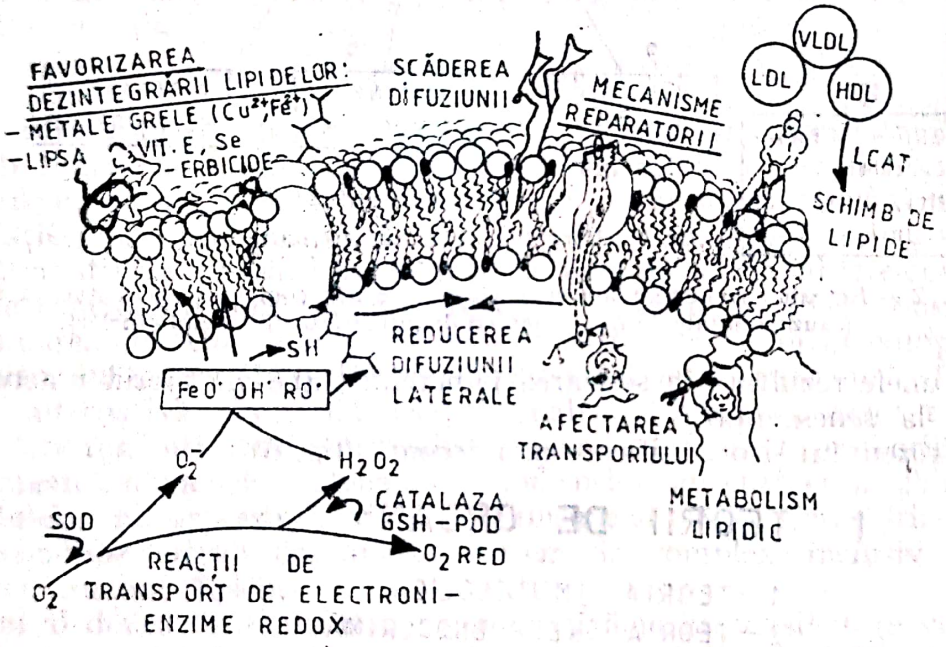


Fig. IX. 4 — Teoria radicalilor liberi exprimată la nivelul membranei prin schema unor alterări posibile și mecanismele protectoare. Acizii grași nesaturați, glucidele și grupările SH al peptidelor pot fi substraturi pentru diferitele specii ale radicalului oxigen. Degradarea peroxidantă a acizilor grași nesaturați conduce la creșterea relativă a colesterolului și implicit, la scăderea fluidității membranei. În consecință vor fi afectate și funcțiile proteinelor integrale din membrană. Schimbul lipidic, metabolismul lipidelor și superoxiddismutaza oficiază mecanisme reparatorii (După D. Hegner, 1980) (59).

membranelor organitelor celulare (144). Această constatare este în general comparabilă și cu obiceiurile alimentare din zonele consacrate printr-un număr mare de longevivi, în unele alimente descoperindu-se factorii cu acțiune antioxidantă (fig. 4, 5).

Scanned with OKEN Scanner

Modificările biomembranelor în procesele de îmbătrînire trebuie considerate drept rezultatnte a cel puțin 3 categorii de alterări: a) ale macromoleculelor îndeosebi ale enzimelor proteolitice; b) modificări directe ale membranelor plasmatică și intracelulare; c) alterări ale matricei intercelulare (colagen, laminină, proteoglicani, glicoproteine).

Dintre celulele preferate în cercetare se detașează fibroblastul de om, consacrat îndeosebi datorită lui L. Hayflick, apoi diverse tipuri de celule

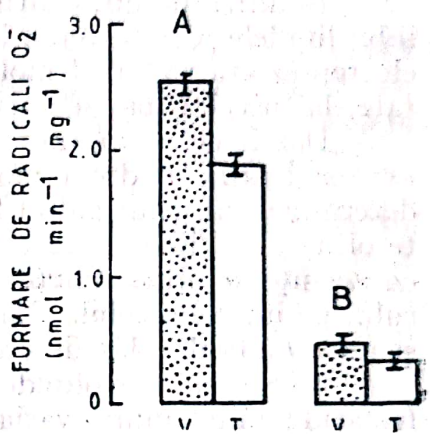


Fig. IX. 5 — Formarea de radicali O_2^- în mitocondriile din celulele miocardice fragmentate (A) și intacte (B), provenind de la șobolani tineri (T, vîrsta 3 luni) și vîrstnici (V, 23 luni) (După D. Hegner, 1980) (59).

epiteliale, hepatocite, celule miocardice, adipocite și celule sanguine. În continuare vom prezenta o serie de rezultate referitoare la variațiile în perioada constituirii senescenței a unor proprietăți fundamentale ale biomembranelor, pentru ca în final să analizăm succint cîteva exemple specifice.

2.1. Modificări ultrastructurale ale biomembranelor

Probele morfologice obținute pînă în prezent sînt pregnante, cel puțin în cîteva situații. Cele mai importante modificări degenerative au fost puse în evidență la nivelul crestelor mitocondriale (139), apoi, o acumulare de lizozomi secundari și vacuole, precum și lobulația nucleilor (83). Crestele mitocondriale apar frecvent orientate longitudinal, numărul mitocondriilor cu creste normale, transversale, scăzînd; concluzia generală a acestor observații este că proporția de membrane intracelulare crește, ca fiind acompaniată de o dezorganizare a crestelor mitocondriale și de o acumulare de debriuri intracelulare datorată lizozomilor secundari. Observațiile sînt în consens cu creșterea dimensiunii celulelor la liniile îmbătrînite diploide, *in vitro*, fenomen observat și *in vivo* la o serie de celule (87, 142). Alte cercetări au relevat creșterea ariei și volumului celulelor hepatice și reducerea numărului de mitocondrii (66).

La nivelul membranei plasmatice probele ultrastructurale sînt în dubiu, astfel, de exemplu, prin utilizarea criofracturării nu s-au constatat modificări certe pe adipocite, cu toate că toleranța scăzută la glucoză este determinată de reducerea globală a numărului de receptori specifici insulinei localizați în membrană (66). Totuși, alți autori pe aceleași celule, constată o reducere a număruiui de particule membranare, ca și a numărului de invaginări, primele corespunzînd receptorilor, iar ultimele fiind expresia morfologică a

Scanned with OKEN Scanner

endocitozei complexelor hormon-receptor (24). Neconcordanța rezultatelor poate fi explicată prin diferențele dintre metodele de preparare; în realitate în materie de studiu ultrastructural al moleculelor membranei tehnicile actuale nu și-au spus ultimul cuvînt.

2.2. Variații ale compoziției biochimice

Modificările din cadrul senescenței vizează atît proteinele cît și, îndeosebi, lipidele. Cunoașterea lor este incompletă, dar absolut necesară, deoarece ele reprezintă suportul molecular al variatelor alterări funcționale constatate la nivelul biomembranelor.

Datele cele mai multe provin de la fibroblastele în cultură, ca urmare a extremei utilizări drept model. Raportul colesterol/fosfolipide este, se știe, determinantul principal al fluidității membranei prin abolirea de către colesterol a tranzițiilor de fază lipidice, cele mai mici modificări ale sale avînd consecințe de ordin funcțional. Acest raport crește ușor odată cu vîrsta donorului pe întreaga celulă, rămîne neschimbat la nivelul membranei plasmatice și mitocondriale, dar descrește cu 50% la nivelul microzomilor.

Cele două fosfolipide majore din fibroblastul de om, fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina variază diferit: la nivelul celulei în totalitate și al membranelor plasmatică, mitocondrială și microzomială, fosfatidilcolina crește, în timp ce fosfatidiletanolamina scade, astfel încît raportul fosfatidilcolină/fosfatidiletanolamină crește de la 2; 1,3; 1,1 și 1,2 (în ordinea structurilor menționate anterior) la vîrsta de 28 ani, respectiv, la 4,5; 6; 2,3 și 4,6 la vîrsta de 56 ani. Alterări minore se constată și în cazul celorlalte fosfolipide (132).

Un alt factor de modulare a fluidității și structurii membranei — acizii grași — se modifică astfel: acidul oleic (18: 1) descrește, în timp ce acidul palmitic (16: 0) crește atît în plasmalemă cît și în membranele intracelulare.

În sinteză, se constată modificări semnificative funcție de vîrsta donorului ale lipidelor membranei exprimate prin: descreșterea raportului sterol/fosfolipide în microzomi, creșterea ratei fosfatidilcolină/fosfatidiletanolamină în membranele plasmatică și mitocondrială și descreșterea fracției acizi grași nesaturați/acizi grași saturați la nivelul fosfolipidelor microzomiale.

În cazul sistemului nervos central, „țintă" principală a proceselor de îmbătrînire, problema evaluării modificărilor este extrem de complexă, din cauza existenței mai multor tipuri celulare cu profiluri lipidice și protidice distincte și cu funcții metabolice diferite. Datele obținute se referă cu predilecție la fracțiunea mielinică a membranei, deoarece ea poate fi separată într-o stare aproape pură. În mielina de șoarece, între 3 și 26 luni, raportul colesterol/fosfolipide crește, iar fracția galactolipide/fosfolipide scade. Scade proporția de acizi grași nesaturați. Pe mielina din creierul de primate și om s-au obținut, de asemenea, modificări ale unor fosfolipide: scăderea diacil-glicerofosfocolinelor și a diacil-glicerofosfoetanolaminelor. Rata *turnover*-ului fosfogliceridelor etanolaminice este redusă în raport cu cea normală (143).

Datele relative la modificările cantitative ale proteinelor membranei în senescență nu sînt edificatoare, în schimb, se constată o amplă serie de alterări funcționale. S-au pus, totuși, în evidență modificări ale proporției diferitelor tipuri de lipoproteine în membrana hepatocitelor de sobolan (9). Suficiente controverse a suscitat scăderea funcție de vîrstă a ATP-ului eritro-

Scanned with OKEN Scanner

citar, în proporţie de 25% faţă de normal, considerîndu-se însă că supravieţuirea celulei este afectată doar la scăderi de 40—50% (94).

Dintre toate modificările compoziţiei membranelor în îmbătrînire rămîn certe cele ale lipidelor, care pot explica variaţia funcţie de vîrstă a sensibilităţii organismului la acţiunea deteriorantă a radicalilor liberi şi a peroxizilor, aspect extrem de important.

2.3. Modificări ale unor proprietăţi biofizice

Creşterea densităţii globulelor roşii funcţie de vîrstă este cunoscută de mult timp şi se produce paralel cu mărirea fragilităţii osmotice (14). Rezultate similare au fost obţinute şi pe trombocite (29). Experimente efectuate în laboratorul nostru au relevat, pe lîngă diferenţa de fragilitate la hematiile izolate funcţie de vîrstă şi aspecte particulare ale curbei de hemoliză la donorii vîrstnici în raport cu adulţii. Cu alte cuvinte, fără să putem afirma cu certitudine că hematiile provenind de la donori în vîrstă sînt mai fragile decît cele recoltate de la adulţi, am observat că procesul de hemoliză diferă prin cinetica sa la cele două grupuri (fig. 6). Concomitent, am constatat şi o

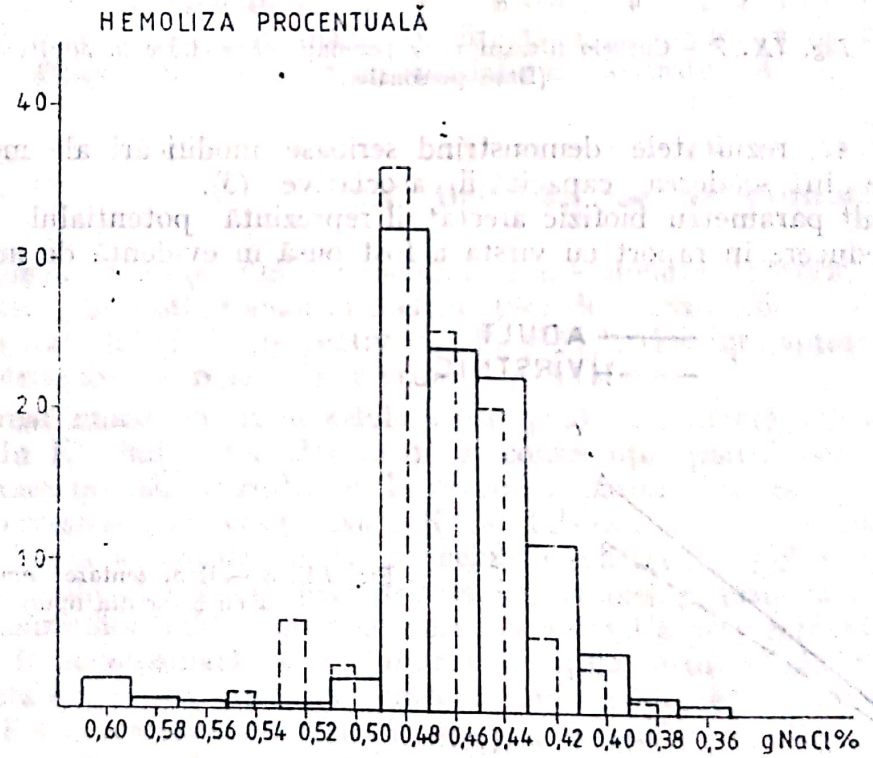


Fig. IX. 6 — Histogramă reprezentînd populaţiile eritrocitare hemolizate la diferite concentraţii: la adulţi sănătoşi (în linii întrerupte) şi la vîrstnici sănătoşi (linii continui) (Date personale).

reducere a filtrabilităţii eritrocitelor provenind de la vîrstnici sănătoşi (fig. 7, 8) (a se vedea şi cap. VII).

Adezivitatea celulară prezintă, de asemenea o dependentă funcţie de vîrstă, celulele devenind mai sensibile şi la fenomenul de inhibiţie de contact. Aşa se explică descreşterea densităţii de saturaţie a celulelor în culturile.

Scanned with OKEN Scanner

îmbătrînite (87). Detaşarea celulelor este considerată unul din factorii determinanţi ai creşterii ratei de moarte celulară *in vitro* (41). La celulele îmbătrînite descreşte tendinţa de formare a unor agregate celulare. Astfel, dacă la celulele tinere (a IV-a generaţie) numărul mediu de componente ale agregatelor a fost de 476, acelaşi număr la celulele senescente din a XIX-a generaţie a fost

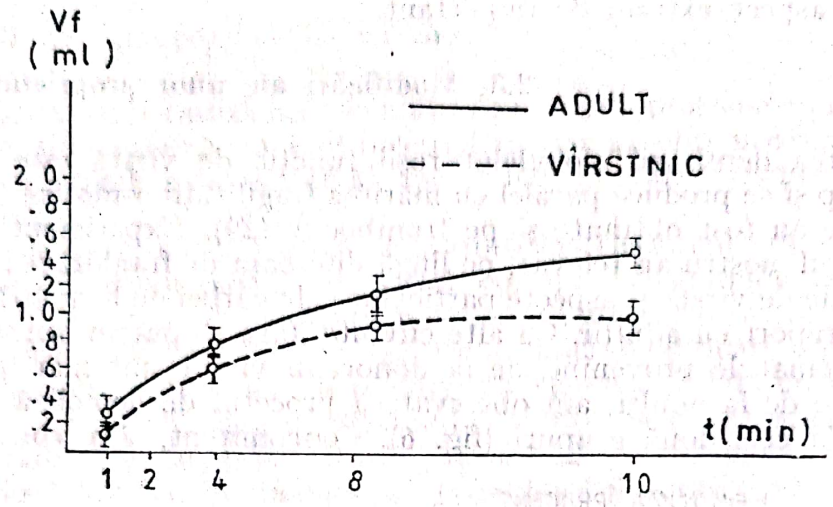


Fig. IX. 7 — Curbele filtrării unor populaţii eritrocitare la adulţi (Date personale).

de numai 42, rezultatele demonstrînd serioase modificări ale membranei, exprimate în scăderea capacităţii asociative (5).

Un alt parametru biofizic afectat îl reprezintă potenţialul de repaus a cărui reducere în raport cu vîrsta a fost pusă în evidenţă de mult timp.

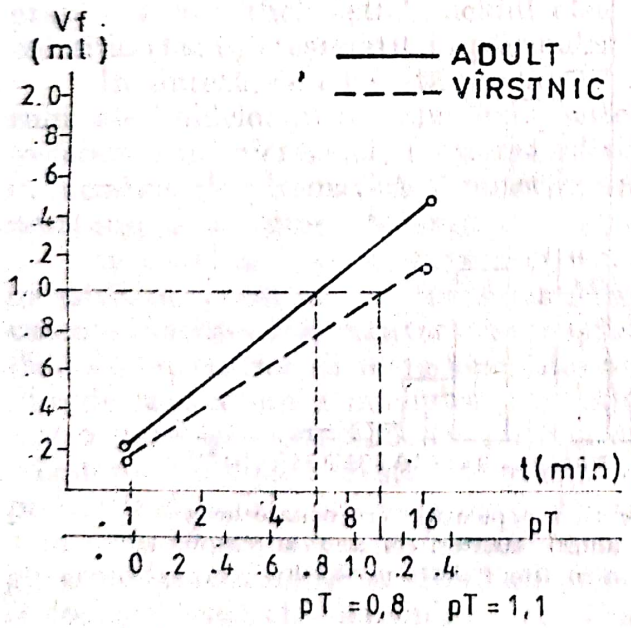


Fig. IX. 8 — Reprezentare semilogaritmică a curbelor din figura 7.

Astfel, s-a măsurat potenţialul de membrană pe muşchii coapsei la şobolanii albinoşi, prin utilizarea de microelectrozi inseraţi în fibrele musculare ale aductorilor şi de macroelectrozi plasaţi pe suprafaţa muşchilor denudaţi. Potenţialul creşte pînă în a 80-a zi, cînd atinge valoarea „adultă" de circa

—90 mV, corespunzînd și maturității sexuale a animalelor. El rămîne o perioadă constant, pentru ca apoi să descrească la o vîrstă avansată (1,5—2 ani) a animalelor (133). Rezultate asemănătoare au fost obținute și la alte animale. Acest fenomen este o rezultantă a modificării transportului de ioni și a creșterii rigidității membranei în cursul senescenței.

În sfîrșit, definită cu certitudine, prin metode reproductibile (a se vedea cap. III) fluiditatea membranei devine tot mai mult un parametru de referință fiind considerată în prezent component esențial al „adaptării homeoviscoase" care asigură mecanismele de homeostazie moleculară (130). Adaptarea homeoviscoasă este afectată odată cu creșterea vîrstei, determinînd scăderea fluidității membranei, deci, creșterea microviscozității acesteia.

La nivelul creierului, alterarea fluidității membranelor pare determinată pentru moment, de creșterea rației molare colesterol/fosfolipide și sfingomielină/lecitină, determinante de bază ale acestei proprietăți (136). Modificările se vor reflecta în primul rînd asupra modulării acțiunii unor proteine din membrană. Aceleași creșteri ale microviscozității membranei au fost probate la nivelul hepatocitelor, celulelor musculare, fracțiunilor mitocondriale și microzomale la șobolan, ca și pe eritrocite, ele fiind consecința creșterii raportului colesterol/fosfolipide (91). A fost măsurată o creștere a microviscozității membranei, prin măsurare directă a fluorescenței de polarizare, chiar și în plasmalema petalelor de trandafir îmbătrînite (16).

2.4. Modificări ale transportului de ioni

Variațiile potențialului de membrană menționate anterior, au atras atenția asupra necesității analizei coeficienților de permeabilitate ai membranei pentru Na^+, K^+ și Cl^- (respectiv P_{Na}, P_K și P_{Cl}), din interacțiunea cărora rezultă potențialul de repaus (a se vedea cap. VIII).

Pe mai multe tipuri de celule a fost pusă în evidență creșterea conținutului în K^+, inițial considerată drept consecința sporirii permeabilității pasive a membranei. În realitate, la nivelul hepatocitelor, de exemplu, s-a probat și o creștere a activității (Na^+, K^+)-ATP-azei, ceea ce înseamnă și o „pompare" mai accentuată a K^+ în celulele senescente. Celulele vîrstnice nu sînt capabile să producă asimetria ionică în același grad cu cele tinere. În cazul neuronilor îmbătrîniți readucerea la normal a permeabilității pentru K^+ poate fi acompaniată de ameliorarea funcțiilor neuronului. Cîteva fapte experimentale sînt promițătoare: tratarea animalelor bătrîne cu fitohemaglutinină-P sau centrofenoxină, substanțe ce provoacă o reducere a K^+ intracelular este acompaniată de o „întinerire" a celulelor nervoase (100).

Alterarea prin îmbătrînire a concentrației cationilor la nivelul cristalinului joacă un rol important în formarea opacităților de la acest nivel și în ultimă instanță a cataractei senile. Datele obținute, exprimate în micromoli/cristalin total sau în micromoli/g apă din cristalin, indică o creștere liniară funcție de vîrstă a ionilor K^+, Na^+ și Ca^{2+}. Creșterea K^+ se reduce la vîrstele foarte înaintate, pe cînd creșterea Ca^{2+} și Na^+ continuă, deși conținutul în apă scade la 60—70% (114).

Scanned with OKEN Scanner

La om s-a stabilit o relație clară între vîrstă și reducerea consumului de oxigen. Deoarece (Na^+, K^+) ATP-aza a fost estimată responsabilă de producerea a peste 50% din termogeneza celulară, a devenit necesară evaluarea acestui sistem enzimatic în îmbătrînire. Ca urmare, măsurîndu-se nivelurile (Na^+, K^+) ATP-azei în omogenate tisulare de la diferite animale s-a pus în evidență un declin al acestor niveluri la vîrstele crescute (19, 28). Studiind nivelul bazal al (Na^+, K^+)-ATP-azei eritrocitare la două loturi de subiecți sănătoși, primul cu vîrsta medie de 30,9 ani (28—35 ani) și al doilea 76,3 (între 63—100), măsurată în nanomoli P-anorganic/mg masă membrană uscată/oră, Gambert și Duthie au constatat o reducere semnificativă la lotul de vîrstnici (fig. 9). Relația cu obezitatea, unde se constată de asemenea o reducere a activității (Na^+, K^+) ATP-azei a fost exclusă prin selecția cazurilor (37). Interpretarea datelor rămîne dificilă, în măsura în care (Na^+, K^+) ATP-aza de la nivelul membranei eritrocitare este alterată într-un număr

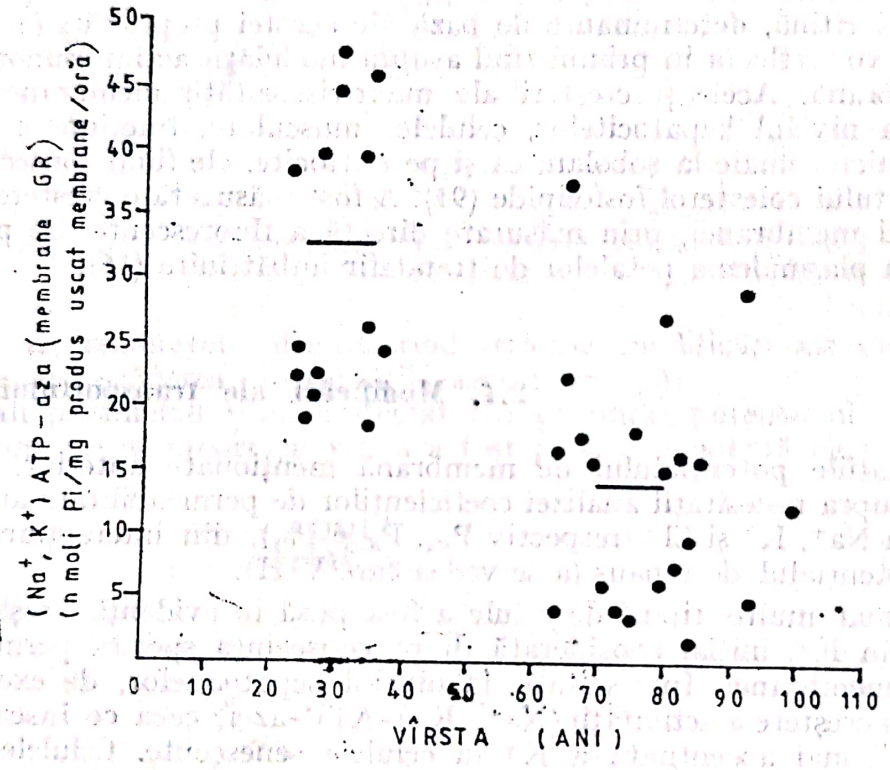


Fig. IX. 9 — Valorile individuale ale activității (Na^+, K^+) ATP-azei din membrana eritrocitară la bărbați în vîrstă de 28—35 ani și 63—100 ani. Liniile orizontale semnifică valorile medii pentru tineri și, respectiv, vîrstnici (După S. R. Gambert și E. H. Duthie, 1983) (37).

important de stări patologice (a se vedea cap. VI). Este posibil ca modificările constatate la bătrîni să constituie expresia stadiului subclinic al unor boli dar nu există probe în acest sens.

Trebuie să observăm, concomitent că activitatea (Na^+, K^+)ATP-azei nu este scăzută, în cadrul senescenței, la nivelul tuturor membranelor celulare. La hepatocite, așa cum am menționat anterior, s-a constatat chiar o creștere. Pentru o edificare mai completă trebuie evaluat și numărul locurilor active de la nivelul membranei ca și numărul moleculelor enzimei „pompă".

Scanned with OKEN Scanner

În acest sens, din cercetările efectuate de C.H. Joiner și P.K. Lauf rezultă că transportul activ de K^+ la eritrocitele tinere este cu 37% mai mare decît la cele îmbătrînite. Utilizînd (^3H) ouabaină ei au constatat o fixare a acesteia cu 33% mai mare pe celulele tinere, ceea ce atestă un deficit de situsuri active la hematiile în vîrstă. Comparînd cele două procente rezultă că afinitatea și *turnover*-ul siturilor active ale pompei de K sînt similare.

Există și alte date probatoare ale modificării transportului la globulul roșu senescent, ca urmare a alterării proprietăților biomembranei. Astfel, s-a constatat o descreștere a activității (Ca, Mg)ATP-azei care ar putea fi consecința reducerii calmodulinei, inductor al acțiunii acestei ATP-aze (85). De asemenea, numeroși cercetători au evidențiat scăderea conținutului de ATP, ulterior fiind observată, concomitent, o creștere a Ca^{2+} și scăderea a Mg^{2+} (79). Toți acești 3 factori sînt determinanți ai deformabilității membranei. Ulterior a fost confirmată și scăderea deformabilității corelată, evident, și cu creșterea microviscozității membranei (10).

Recent au fost demonstrate modificări ale transportului de anioni prin membranele hematiilor senescente, fapt semnificativ datorită intervenției acestui sistem în transportul CO_2 tisular. Astfel, efluxul de SO_4^{2-} este cu 20% mai mare decît la celulele tinere, interpretat ca un mecanism compensator al creșterii nivelului intracelular de Ca^{2+}. Altă explicație posibilă ar fi reducerea cu 20% a apei și implicit a volumului celular, constatată la globulele roșii îmbătrînite (157). S-a mai semnalat creșterea tendinței de formare a unor microvezicule de către membrana eritrocitară, vizibile prin microscopie electronică (86). A fost confirmată existența la nivelul suprafeței, a unui „antigen de senescență" ce pare corelat cu banda 3, proteină responsabilă de transportul anionic prin membrană (141). Existența modificărilor menționate mai sus poate confirma această corelație.

2.5. Receptorii celulari în procesul de îmbătrînire

Cercetări deosebit de productive au condus la izolarea și caracterizarea unui important număr de receptori deci, la materializarea unui concept ce mult timp a fost doar operațional. Ca urmare, a devenit posibilă realizarea unor studii aprofundate ale implicării receptorilor în senescență, datele obținute constituind subiectul unor treceri în revistă recente (30, 71, 125, 126, 130). De fapt, numeroasele studii anterioare, referitoare la modificările enzimatice și ale acțiunii hormonilor, au deschis calea studiului receptorilor în procesele de îmbătrînire (43, 50, 61, 124, 126, 127, 132).

2.5.1. *Perturbări ale reglării receptorilor*

Funcțiile receptorilor pot fi reglate pe trei căi principale: variația numărului de receptori, a afinității și a poziției acestora în membrană. Toate aceste alternative de reglare sînt mai mult sau mai puțin alterate în senescență, afectare extinsă la diverse tipuri de membrane și conducînd în ultimă instanță la o infidelitate a transferului de informație specifică receptorilor implicați. Modificările receptorilor în procesul de îmbătrînire sînt atît de ample încît se pun două probleme de ordin conceptual și anume, dacă

Scanned with OKEN Scanner

aceste alterări au un rol determinant în geneza senescenței (conturîndu-se chiar o teorie a receptorilor, ce poate fi de altfel inclusă în teoria de membrană) sau ele reprezintă doar o consecință a îmbătrînirii. În realitate sînt posibile ambele alternative (45).

Concentrația mai multor hormoni scade în cursul senescenței (insulină, ACTH, norepinefrină, estradiol, cortizol, tiroxină, izoprotenerol), alteori aceasta este scăzută la nivelul unor celule sau organe și crescută în altele (de exemplu, concentrația de epinefrină scade în aortă și adipocite și crește la nivelul ficatului, glucagonul crește la nivel hepatic și scade la nivelul adipocitelor). În general însă reducerea concentrației de molecule semnal, hormoni și neurotransmițători îndeosebi, este mai frecventă.

Modificarea nivelului de molecule purtătoare de informație presupune variații ale numărului de receptori pentru menținerea celulelor la nivel funcțional normal. Deocamdată, proba directă a diminuării numărului de receptori, pornind de la genom pînă la sinteza finală a proteinei-receptor, este doar în curs de clarificare pentru un număr redus de situații. De aceea, numeroasele date existente se referă la capacitatea receptorului, echivalentă cu numărul locurilor de legare (a se vedea cap. V). În mod particular a fost studiat sistemul dopaminergic central, datorită modificărilor certe în îmbătrînire și paralelismului acestora la o serie de animale utilizate ca model (18, 135). Datele obținute servesc la explicarea fiziopatologiei sindroamelor creierului îmbătrînit și a răspunsului acestuia la medicamentele cu acțiune centrală. Astfel, a fost examinată funcția dopaminei nigro-striatale la două rase de șoareci în timpul tratamentului cronic cu un antagonist al dopaminei (haloperidol) și cu un agonist (bromocriptină). După 21 zile de tratament cu haloperidol (vîrsta loturilor de șoareci, 5, 12 și 24—26 luni) la primele două loturi tinere s-a constatat o creștere cu 30% a legării ^{3}H-haloperidolului, la lotul bătrîn neexistînd nici o modificare. Afinitatea de legare a fost nemodificată. Tratamentul timp de 8 zile cu agonistul bromocriptină a condus la reducerea capacității de legare cu 30%, 14% și 23% la cele 3 loturi, fără modificări de afinitate. Rezultate similare au fost obținute pe pineala de șobolan (110). Aceste rezultate susțin reducerea receptorilor pentru dopamină în corpul striat, contestată în alte cercetări, prin care s-a constatat creșterea legării ^{3}H-haloperidolului, la șoarece între 4—24 luni (cu cea mai mare creștere între 4 și 7 luni) și cu un declin între lunile 24—30 (93). Totuși există mai multe argumente pentru scăderea numărului de receptori specifici dopaminici funcție de vîrstă. Denervarea unilaterală a corpului striat provoacă o „hipersensibilizare" a sistemului cu proliferarea receptorilor în zona lezată. Pe șobolani de rasă Wistar s-a demonstrat că proliferarea receptorilor pentru dopamină la animalele bătrîne a avut aceeași extensie ca la cele mature. La loturile de control însă șobolanii senescenți prezentau o densitate mai redusă decît cei maturi. Este interesant că adenilaticlaza bazală nu diferea la animalele lezate și nelezate, dar acțiunea dopaminei la doze mici, crescute treptat, era paralelă cu creșterea numărului de receptori (69). Utilizînd același model experimental s-a constatat o hipersensibilizare mai importantă la șobolanii tineri (85%) în raport cu cei vîrstnici (61%).

Abilitatea celulelor de a resintetiza receptorii scade în cursul îmbătrînirii și poate fi corelată cu modificarea mecanismelor specifice de transport pentru aminoacizi, factor important în mecanismul reglării sintezei proteinelor. Mai multe cercetări indică o reducere a ratei sintezei receptorilor la animalele

Scanned with OKEN Scanner

în vîrstă, dar alterările se pot produce și în cursul maturației acestora. Frecvent, în experimentele efectuate se administrează animalelor blocanți ireversibili ai receptorilor, urmărindu-se apoi regenerarea subsecventă a structurilor receptoare. Astfel, utilizîndu-se blocanți ireversibili β-adrenergici la șobolani senescenți (vîrsta de 27 luni) și tineri, receptorii respectivi au fost măsurați după 20—30 zile la nivelul inimii, plămînilor și creierului. Agenții blocanți nu traversează bariera hematoencefalică, deci, receptorii din creier nu au fost blocați, ca urmare nefiind necesară o regenerare. Regenerarea β-receptorilor în inimă și plămîni a fost la nivelul organelor îmbătrînite de 2—5 ori mai lentă (158).

În general, scăderea densității receptorilor este acompaniată de o scădere a afinității. Acest fenomen a fost demonstrat în laboratorul nostru pentru receptorii specifici insulinei, la nivelul eritrocitelor (fig. 10). Numărul de receptori insulinici la nivelul celulelor sanguine din cordonul ombilical este de 2—6 ori mai mare decît la nivelul celulelor sanguine ale adultului. Rezultate analoge au fost constatate pe fibroblaste și adipocite, observîn-

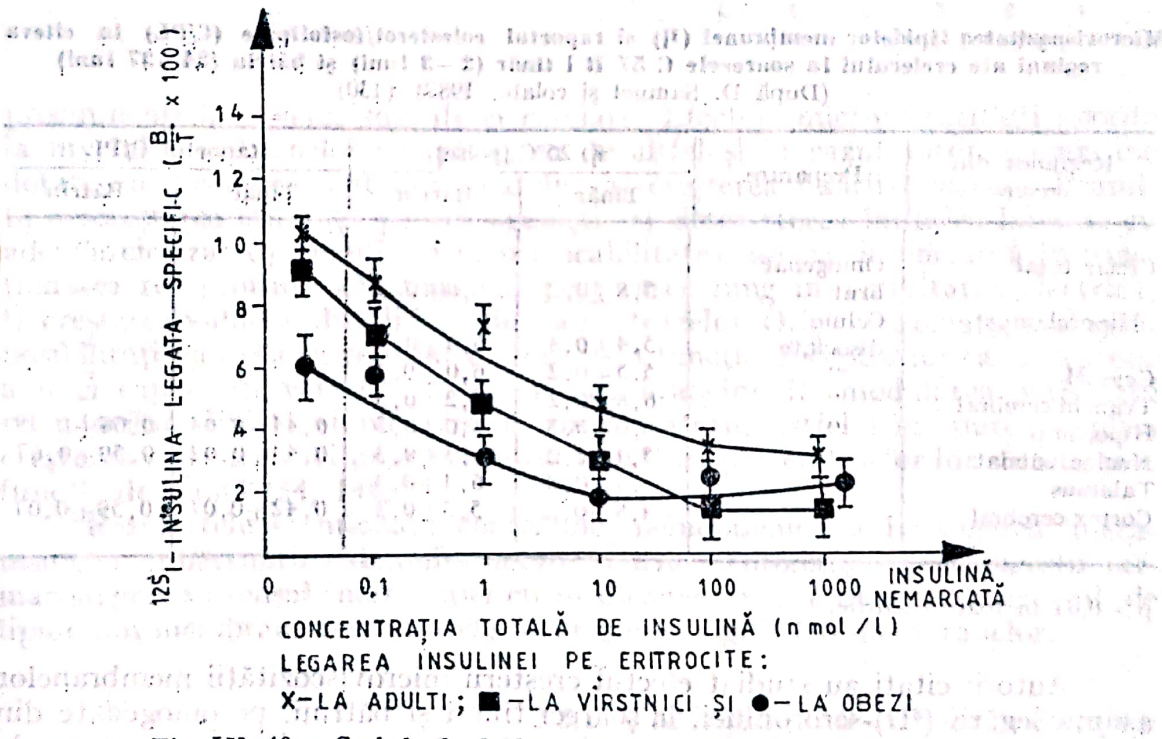


Fig. IX. 10 — Curbele de deplasare ale ocupării receptorilor de către insulina nemarcată, obținute pe eritrocite provenind de la 3 loturi de subiecți: adulți, vîrstnici și obezi (Date personale) (128).

du-se o scădere a numărului de situsuri și a afinității cu vîrsta (147). În cazul receptorului androgenic pentru dihidrotestosteron în prostata șobolanilor de diferite vîrste s-a găsit o afinitate de legare redusă la animalele în vîrstă de 18 luni, comparativ cu cele de 80 zile și, de asemenea, s-a observat o scădere a numărului locurilor de legare (45). Alterarea receptorilor și a răspunsului la moleculele purtătoare de informație, îndeosebi hormoni și neurotransmițători, a fost relevată în multe alte lucrări.

Scanned with OKEN Scanner

Modificarea poziției receptorilor în membrană reprezintă un alt factor de reglare modificat în procesele de îmbătrînire. Astfel, în glanda pineală a șobolanilor sensibilitatea receptorilor β-adrenergici este variabilă în cadrul ciclului lumină/întuneric. Întrucît acest ciclu este independent de sinteza proteinelor, variațiile rezultă din redistribuirea receptorilor la nivelul membranelor (122). La animalele în vîrstă β-receptorii sînt incapabili de redistribuire, deoarece nu se produc modificări sub influența ciclului lumină/întuneric (42).

Deosebit de actuale sînt cercetările influenței fluidității membranelor sinaptice asupra proprietăților receptorilor în senescență. Astfel, D. Samuel și colab. (130) au constatat, la șoarecii C 57B l, o creștere a microviscozității membranelor în cele mai multe regiuni ale creierului la șoarecele bătrîn comparativ cu cel tînăr. Diferența a fost mai importantă în cortexul caudat și hipocamp, unde crește de asemenea și rata colesterol/fosfolipide (tabel I).

TABEL I

Microviscozitatea lipidelor membranei ($\bar{\eta}$) și raportul colesterol/fosfolipide (C/PL) în cîteva regiuni ale creierului la șoarecele C 57 B l tînăr (2—3 luni) și bătrîn (24—37 luni)
(După D. Samuel și colab., 1982) (130)

Regiunea din creier	Preparare	$\bar{\eta}$, 25°C (poise)		Raportul C/PL	
		Tînăr	Bătrîn	Tînăr	Bătrîn
Creier total	Omogenat brut	5,8±0,2	6,0±0,3	—	—
Hipotalamus	Celule disociate	5,4±0,4	6,0±0,3	—	—
Cerebel	,,	5,5±0,2	6,0±9,3	—	—
Trunchi cerebral	,,	6,8±0,2	7,2±0,3	—	—
Hipocamp	,,	5,0±0,3	6,0±0,3	0,44±0,04	0,66±0,18
Nucleu caudat	,,	5,1±0,2	6,3±0,3	0,43±0,02	0,59±0,07
Talamus	,,	5,4±0,4	6,1±0,3	—	—
Cortex cerebral	,,	4,8±0,2	5,3±0,2	0,42±0,01	0,59±0,01

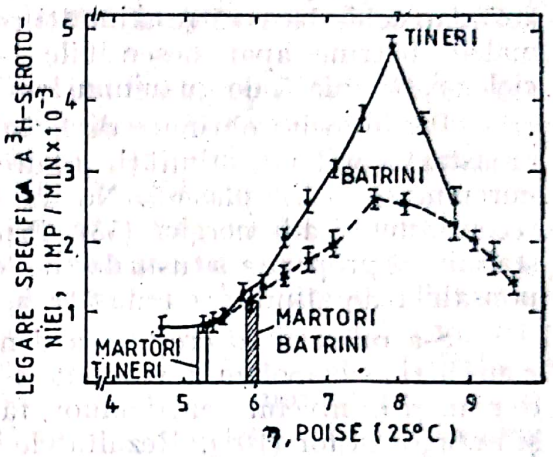
$p > 0,01$ în toate cazurile.

Autorii citați au studiat efectul creșterii microviscozității membranelor asupra legării (^{3}H)-serotoninei, la șoareci tineri și bătrîni, pe omogenate din creierul anterior. Loturile de control probează o capacitate mai mare de legare a serotoninei și șoarecii vîrstnici, în raport cu cei tineri, datorită viscozității ridicate a membranelor. Crescînd artificial microviscozitatea membranelor prin administrarea de hemisuccinat de colesterol la șoarecii tineri și vîrstnici va spori numărul de locuri de legătură a serotoninei, în comparație cu loturile de control netratate. Creșterea este mult mai importantă la șoarecii tineri (de 6 ori) față de cei senescenți (2,2 ori) numărul maxim de situsuri specifice serotoninei fiind cu 83% mai mare pe membranele preparate de la lotul tînăr. Nu este clar dacă reducerea potențialului de legare a membranelor în cazul șoarecilor în vîrstă este consecința reducerii sintezei proteinelor receptoare, sau a creșterii ratei de degradare. Rezultatele concordă cu cele publicate de J.C. Shih și H. Young (citați de 130) referitoare la creșterea

Scanned with OKEN Scanner

legării serotoninei, dar cu reducerea afinității, pe membranele sinaptice din creierul de bătrîn (om), comparativ cu adultul tînăr. Experiențe similare s-au efectuat și cu (^{3}H)-D-ala-enkefalinamidă (130).

Cum se explică aceste rezultate? Se consideră că pe măsura creșterii microviscozității membranei și, deci, a rigidității sale, receptorii sînt tot mai



Gig. IX. 11 — Legarea specifică a ^{3}H-serotoninei pe omogenatul de creier anterior la șoarecii C57B1 tineri și bătrîni în funcție de microviscozitatea membranei. Se constată o fixare net mai redusă la lotul de animale vîrstnice (După D. Samuel și colab. 1982) (130).

proeminenți la nivelul suprafeței celulare. Efectele microviscozității sporite la nivelul membranelor sinaptice, ca de altfel și în cazul altor membrane dotate cu receptori, sînt următoarele: a) creșterea fixării moleculei ligand; b) descreșterea afinității pentru agoniști; c) descreșterea întîlnirii laterale cu adenilatciclaza; d) modificări în permeabilitatea ionică, importantă în funcționarea receptorilor; e) schimbări pe termen lung în activitatea electrică; f) creșterea vulnerabilității la acțiunea proteazelor. Orice combinație a acestor posibilități va avea ca rezultat o reducere a funcției receptorilor ca o expresie a unei capacități versatile reduse a membranelor în modularea activității receptorilor. Există și mecanisme compensatorii, astfel s-ar putea explica creșterea concentrației unor neurotransmițători și a enzimelor lor sintetizante funcție de vîrstă (34, 149).

Rezultatele menționate contribuie, neîndoielnic, la înțelegerea mecanismelor îmbătrînirii sistemului nervos central. Totodată, oferă sugestii farmacologice, în sensul intervenției cu medicamente care să reducă excesul de lipide din membrane responsabile de creșterea rigidității membranelor.

2.5.2 — *Modificări ale etapelor postreceptor*

Dacă modificările receptorilor în procesul de îmbătrînire au beneficiat de foarte multe abordări experimentale, etapele postreceptor au fost cercetate mai puțin. Se știe că receptorul este cuplat cu adenilatciclaza prin intermediul unei proteine guaninnucleotid-senzitivă (G_s). Proporția receptorilor cu afinitate mare este proporțională cu abilitatea receptorului de cuplare cu complexul efector adenilatciclază, indice important de urmărit în etapa postreceptor. Agoniștii induc modificări ale receptorilor crescîndu-le afinitatea iar concentrațiile mari (10^{-4}M) de GTP (guanozin-trifosfat) subunitate componentă a proteinei G_s convertesc afinitatea înaltă indusă de agoniști în afinitate redusă (34, 149).

În mai multe lucrări s-au urmărit modificările posibile ale indicelui de cuplare, fiind observată, de exemplu, scăderea afinității agoniștilor β-adrenergici în plămînul senescent la șobolani (131). La nivelul membranelor cardiace, pe șobolanii în vîrstă de 25 luni comparativ cu cei de 3—4 luni, a fost de asemenea demonstrată o reducere a afinității receptorilor β-adrenergici (102). Competiția agoniștilor studiată în prezența guaninnucleotizilor a arătat o schimbare către afinități reduse la animalele tinere, în timp ce animalele bătrîne apar nesensibile la guaninnucleotizi. Activitatea adenilatciclazei stimulată de guaninnucleotizi este scăzută la șobolanii în vîrstă.

Pe limfocite obținute de la loturi de subiecți tineri și în vîrstă s-a demonstrat corelarea afinității β-adrenergice a agoniștilor cu concentrația de norepinefrină din plasmă. Nu au fost constatate modificări ale densității receptorilor β-adrenergici (33). Prin tehnici de modelare pe computer s-a stabilit că proporția situsurilor de legare descrește cu vîrsta, aceasta fiind responsabilă de afinitatea redusă a agoniștilor.

S-a observat o creștere a densității receptorilor muscarinici la nivelul zonei atriale (șobolani în vîrstă de 24—25 luni, comparativ cu cei de 3—4 luni), dar nu și la nivelul ventriculilor, fără vreo diferență în afinitatea agoniștilor și antagoniștilor (101). Rezultatele au fost confirmate pe diferite regiuni ale creierului.

În scopul „disecției" acțiunilor componentelor sistemului ciclazic se utilizează Na^+ și forskolin-diterpina, stimulatori ai activității adenilatciclazei nemediate de receptori. Nu se cunoaște precis modul de acțiune al acestor substanțe, dar este sigur că ele nu acționează la nivelul receptorilor. În două studii s-a constatat, la nivelul plămînului de șobolan vîrstnic (25 luni) în raport cu animalul tînăr (4 luni), o reducere la jumătate a activității adenilatciclazei nemediate de receptori, prin excluderea artificială a acestora de către substanțele amintite (101, 131).

Într-o serie de lucrări se evidențiază afectarea activității enzimatice prin modificările fluidității membranei. Cu alte cuvinte, receptorii pot fi influențați direct de către fluiditatea membranei, dar și indirect la nivelul sistemelor de cuplare. Astfel, la nivelul adenilatciclazei modificarea informației transmisă de la complexul ligand-receptor apare în directă legătură cu alterările fluidității membranelor (64). Prin modificarea experimentală a fluidității membranei s-au obținut alterări ale fosforilării unor proteine care ar putea afecta transmiterea informației (130).

Se știe că în afara adenilatciclazei există și alte sisteme efectoare ce intervin în transmiterea informației, în acest caz cercetările fiind abia la începuturi. Astfel, la nivelul glandei parotide de șobolan eliberarea K^+, care activează receptorii α-adrenergici, este modulată de reînnoirea fosfolipidelor și mobilizarea calciului. Un studiu recent atestă existența unor diferențe între eliberarea K^+ la șobolanii în vîrstă de 3, 12 și 24 luni. A fost constatată o reducere a încorporări ^{32}P în fosfatidininozitol odată cu creșterea vîrstei (65). Într-un alt studiu s-a demonstrat, deși cu date statistice insuficiente, posibilitatea creșterii legării (^3H)-diazepamului funcție de vîrstă (21). Se oferă astfel sugestia unei explicații plauzibile a sensibilității deosebite pe care o au pacienții vîrstnici la medicamentele anxiolitice. Probleme deosebite pune toxicitatea crescută a digitalei la vîrstnici, adică la o grupă importantă de pacienți potențiali. Datorită faptului că (N^+, K^+)-ATP-aza este asociată

Scanned with OKEN Scanner

cu receptorii pentru glicozizii cardiaci, enzima reprezintă un factor important de care depind efectele toxice. În consecință, se încearcă o explicație a toxicității pornind de la această relație (11).

2.6. Mecanismele imune în procesele de senescență

În cadrul unei ipoteze mai vechi, senescența traduce pierderea eficacității protecției imunologice a organismului, elaborîndu-se chiar o teorie imunologică a îmbătrînirii (150, 151). Cele mai multe lucrări s-au referit, pînă în prezent, îndeosebi la anomalii cantitative ale marilor funcții imunologice, cum sînt capacitatea de respingere a grefelor, cooperarea între celulele imunocompetente sau producerea de anticorpi specifici. S-au pus în evidență numeroase modificări, iar în ultimii ani se încearcă să se explice dacă acestea sînt provocate de evenimente independente, sau dimpotrivă au o cauză comună. Ultima alternativă a captat sistematic mai mulți aderenți, considerîndu-se frecvent drept responsabilă de deficiențele sistemului imunitar involuția timusului funcție de vîrstă cu o descreștere corespunzătoare a hormonului corespunzător, fenomen demonstrat la șoarece prin scăderea producerii limfocitelor B (6, 20, 32, 150). A fost descrisă o reducere a funcției imune celulare și umorale, considerată drept cauză a creșterii incidenței infecțiilor, cancerului și bolilor autoimune o dată cu înaintarea în vîrstă (20, 88, 150). S-a afirmat chiar că descreșterea imunității celulare este în relație cu decesul prematur al persoanelor în vîrstă (88). Rezultatele sînt însă de o mare variabilitate, dependente de tehnicile utilizate și criteriile alegerii materialului biologic studiat. În scopul prevenirii rezultatelor contradictorii recent (1984), în cadrul programului EURAGE al Comunității Europene, au fost propuse criterii riguroase în studiile de imunogerontologie umană, care iau în considerare informații clinice, date de laborator și interferențe farmacologice posibile (82).

Printre cauzele considerate la originea variatelor modificări imunologice din cadrul senescenței, alterările membranelor limfocitare ocupă un loc central. Modificările funcționale și ale capacității de descriminare a limfocitelor depind de existența unor receptori specifici existenți atît la nivelul suprafeței celulelor imunocompetente cît și a celulelor țintă din organism.

Alterările sistemului imun funcție de vîrstă se exprimă în: a) creșterea producției de imunoglobuline, aparent în afara unei stimulări antigenice și modificarea raportului între diferite tipuri de imunoglobuline (17): b) scăderea capacității de reacție la stimularea antigenică produsă de bacterii, virusuri celule tumorale, sau lectine (60, 63); c) creșterea capacității de producere a unor anticorpi îndeosebi antifactor reumatoid și antinucleari (12, 44). Aceste modificări au fost corelate cu frecvența unor boli la vîrstnici: diferite tipuri de alergii, glomerulonefrite, aortite, cancer, arterioscleroză și altele.

S-a stabilit dependența de vîrstă a populațiilor limfocitare B și T, cu mențiunea că limfocitele T prezintă modificări ale proprietăților specifice, paralel cu o creștere a numărului de limfocite B. Modificările sînt mai accentuate la sexul masculin (63).

Cea mai tentantă direcție în cercetarea rolului membranelor în îmbătrînire constă în relevarea diferențelor dintre antigenele de suprafață ale limfocitelor provenind de la subiecții în vîrstă în raport cu donorii tineri. R.E. Callard și colab. (22) au selecționat în acest scop două loturi de șoareci apar-

Scanned with OKEN Scanner

ținînd aceleiași linii consanguine, în scopul reducerii diferențelor de identitate imunologică. Animalele de același sex, masculin, au reprezentat, cele 2 grupe consacrate în acest model experimental: tinere (vîrsta de 3—4 luni) și bătrîne (24—30 luni). Au fost izolate apoi, limfocitele din splină unde ele se află concentrate. O fracțiune din fiecare suspensie celulară a fost iradiată, în scopul prevenirii diviziunii celulare ce se produce la nivelul limfocitelor o dată cu recunoașterea de către acestea a unor antigene străine. Autorii citați au efectuat apoi culturi mixte de limfocite, corespunzînd următoarelor 4 combinații posibile: limfocite tinere iradiate; limfocite tinere cu limfocite bătrîne iradiate; limfocite bătrîne cu limfocite bătrîne iradiate; limfocite bătrîne cu limfocite tinere iradiate. Pentru concizie s-a utilizat denumirea de limfocite tinere pentru celulele provenind de la animale tinere și, în mod analog, de limfocite bătrîne. Dacă limfocitele neiradiate vor recunoaște pe limfocitele iradiate antigenele străine ele vor reacționa prin diviziune celulară. Ori, s-a observat că reacția de diviziune celulară se produce la limfocitele neiradiate din următoarele culturi mixte: limfocite tinere/ limfocite bătrîne iradiate și limfocite bătrîne/limfocite tinere iradiate, lipsind din celelalte două culturi mixte. Rezultă cu certitudine existența unei diferențe între antigenele de suprafață ale limfocitelor provenind de la animalele tinere în comparație cu limfocitele animalelor vîrstnice. Din experimente menționate se poate ajunge la concluzia existenței la suprafața limfocitelor a unor antigene „tinere" și „vîrstnice" în funcție de vîrsta subiecților. Antigenele „vîrstnice" au fost puse în evidență și în mod direct. Astfel, dacă se imunizează șoareci tineri — cu limfocite provenind de la animale bătrîne din aceeași sușă consanguină se obține un antiser capabil să recunoască, datorită anticorpilor pe care îi conține, 7—8% din limfocitele animalelor vîrstnice, inactivîndu-le. Deși există lucrări anterioare asupra unor diferențe antigenice funcție de vîrstă, acestea se refereau îndeosebi la antigenele virale. Metoda culturilor mixte de limfocite permite, însă, relevarea unor modificări ale antigenelor Ia, conținuți în molecule ale suprafeței limfocitelor și sintetizate sub controlul genelor clasei a II-a sistemului H-2. Menționăm că sistemul H-2 reprezintă sistemul major de histocompatibilitate la șoarece. Se știe că aceste antigene sînt localizate deși, variabile ca densitate, pe suprafața tuturor celulelor, cu excepția eritrocitelor. Rămîne de văzut dacă modificările constatate pe limfocite sînt prezente și la nivelul altor suprafețe celulare. Pe de altă parte, rămîne de precizat dacă anomaliile moleculelor sînt responsabile de multiplele modificări imunologice constatate cel mai adesea clinic, în perioada senescenței. Relația este foarte probabilă, deoarece moleculele Ia sînt fundamentale în cooperarea intercelulară, modificările lor conducînd, în consecință, la o dificultate mai mare a organismului în respingerea tumorilor, ca și la o diminuare a apărării antibacteriene și antivirale. Alterarea antigenelor Ia ar putea fi și la originea dereglărilor imunitare din cadrul bolilor autoimune frecvente la vîrstnici.

Originea alterărilor antigenelor Ia rămîne deocamdată la stadiul ipotezelor. Este posibilă incriminarea unor modificări ale microviscozității membranelor limfocirare, provocată prin anomalii ale colesterolului, sau ale concentrației acestei molecule. Ca urmare ar putea fi impiedicată expunerea antigenelor la suprafața biomembranei (117). Nu pot fi excluse nici mutațiile somatice, sau erorile în sinteza proteinelor, frecvente în perioada senescenței.

Cercetările menționate sînt de o importanță particulară, în cazul cînd vor fi confirmate în cazul sistemului HLA de la om, parte componentă

Scanned with OKEN Scanner

a complexului major de histocompatibilitate, ansamblu genetic localizat pe brațul scurt al perechii a șasea de cromosomi somatici. Acest sistem este implicat, așa cum se știe, în determinismul unor boli, iar cunoașterea variațiilor specifice senescenței va contribui la clarificarea cauzelor vulnerabilității crescute la o serie de maladii, certă în această perioadă a vieții.

Mai numeroase sînt datele referitoare la variațiile funcțiilor celulelor imunocompetente în îmbătrînire. Astfel, s-a constatat că răspunsul celulelor T este în declin cu vîrsta, atît *in vitro* cît și *in vivo* (76). Încercările de a releva la nivelul subpopulațiilor limfocitare T marcheri specifici în relație cu vîrsta au condus la rezultate nesemnificative (81). În diferite condiții experimentale, s-a constatat sporirea, sau mai frecvent declinul funcțiilor modulatoare exercitate de limfocitele T_H *(helper)* și T_S (supresoare), toate aceste date fiind argumente ale unui defect calitativ comun al limfocitelor T în cadrul senescenței (43, 77). Unele rezultate confirmă această ipoteză; astfel s-a semnalat diminuarea sintezei de ADN stimulată de fitohemaglutinină la nivelul limfocitelor din sîngele periferic al vîrstnicilor. Consecințele constau în reducerea numărului de limfocite T activate, precum și în o deteriorare a potențialului proliferativ din cadrul răspunsului imun (58). Ca urmare, în numeroase lucrări asupra imunosenescenței se examinează procesele biochimice asociate activării limfocitelor T. Astfel, creșterea permeabilității membranei, indusă de fitohemaglutinină, adevărat „semnal general al mecanismului de activare celulară", nu alterează captarea Ca^{2+} la vîrstnici (72). Rezultate negative s-au obținut pentru fluxurile de K^+. Prin stimularea cu fitohemaglutinine a limfocitelor din sîngele periferic, recoltate de la vîrstnici și adulți, magnitudinea și durata creșterii fluxurilor de K^+ induse nu a fost diferită. S-a observat doar o creștere episodică a influxului de K^+ la celulele provenind de la vîrstnici, după 20 ore de preincubare, dar fără stimulare (73). Rezultatele menționate nu concordă cu relevarea creșterii numărului de receptori pentru fitohemaglutinine sau a afinității acestora, la nivelul suprafeței limfocitelor din sîngele periferic (23).

Coexistența unei activări normale la limfocitele senescente cu alterări ale receptorilor poate apărea contradictorie. Totuși, o serie de modificări biofizice ale membranei limfocitare ar putea clarifica discordanța datelor. Astfel, prin tehnici de RES și RMN s-a constatat o creștere a ordinii membranei, deci, o rigidizare a acesteia pe limfocite provenind de la subiecți umani în vîrstă (116). Este clar că la nivelul unei membrane mai rigide transducția mesajului ligand-receptor și chiar afinitatea receptorilor se pot modifica. Afectînd funcțiile limfocitelor, modificările menționate pot fi corelate direct cu descreșterea imunocompetenței odată cu vîrsta. În plus, există un paralelism între alterările proprietăților membranelor și ale funcțiilor asociate ale limfocitelor și alterările altor celule, inclusiv tisulare. De exemplu, modificările parametrilor de ordine ai membranei explică alterarea cuplării receptorilor beta-adrenergici cu adenilatciclaza observate la limfocitele vîrstnicilor (33), similară cu alterarea populației beta-receptorilor observată la nivelul creierului de șobolan (153). Datele contradictorii uneori, se explică, prin diferențe generate de metode sau de modelele animale utilizate.

Se ajunge astfel, din nou, la o concluzie frecventă în ultima vreme: rolul infidelității transferului de informație în procesele de îmbătrînire (97).

Scanned with OKEN Scanner

2.7. Modificările lamelor bazale

În această secțiune vom examina pe scurt caracteristicile unor forme structurale diferențiate extracelulare în perioada îmbătrînirii extracelulare. Este cazul lamelor sau membranelor bazale și al laminelor elastice, a căror organizare moleculară reprezintă o rețea fibrilară tridimensională complexă, alcătuită din colagen, proteoglicani și glicoproteine (a se vedea cap. V).

Devine tot mai clar că macromoleculele ce alcătuiesc membranele bazale sînt sintetizate și excretate de către anumite celule epiteliale, asamblate în spațiul extracelular, în ghidarea acestor circuite intervenind membranele celulare. În consecință, modificările ratelor de sinteză și ale secreției de componente macromoleculare reprezintă un factor important în morfogeneza și expresia funcțională a membranelor bazale. Senescența poate fi acompaniată de schimbări ale acestor rate, care conduc la alterări structurale. Este rațiunea pentru care schimbările cantitative au fost corelate, cu o serie de stări patologice și îndeosebi cu apariția diabetului la bătrîni (75). Unii autori au semnalat la vîrstnici o creștere semnificativă a grosimii membranei bazale de la nivelul capilarelor. Diametrul membranei bazale crește în general cu vîrsta dar sporirea sa este mai precoce la diabetici față de restul populației. Procesul ar putea fi corelat cu intoleranța la glucide și are un caracter segmentar, nedezvoltîndu-se uniform pe toată lungimea capilarului. Aceasta deoarece chiar rata de sinteză și degradare a componentelor membranelor bazale este variabilă, unele celule ale endoteliului capilar rămînînd normale. Este interesantă pentru interpretarea datelor și creșterea grosimii membranelor bazale ale capilarelor funcție de distanța cap-picioare, observată la omul adult și la girafă (75).

Deoarece studiile mai recente au permis o analiză aprofundată a macromoleculelor componente ale membranei bazale, se poate afirma implicarea în alterare a lamininei, glicoproteină cruciformă multifuncțională. În fenomenele care privesc ansamblul dinamicii membranelor bazale, concentrația din plasmă a lamininei poate constitui un indice important al evolutivității și severității procesului degenerativ (115).

La om s-a constatat o creștere în funcție de vîrstă a membranelor bazale glomerulare și ale epiteliului pulmonar, ca urmare a sporirii încorporării prolinei și glucozaminei. Creșterea ratei de sinteză a colagenului se exprimă morfologic prin apariția la nivelul membranelor bazale a unor striații încrucișate (74). Procesul pare extins și la țesutul conjunctiv în totalitatea sa, unul din rezultate fiind sporirea conținutului în glicoproteine și colagen la nivelul cristalinului, mai accentuată la diabeticii în vîrstă (109). S-a raportat și o creștere a gradului de hidroxilare a lizinei și a glicolizării hidroxilizinei.

Alte exemple de modificări ale diferențierii membranelor bazale vizează corpii ciliari din ochiul uman și membrana tectorială a organului Corti (111).

Lamelele elastice tinere sînt bogate în glicoproteine și sărace în elastină. Cu vîrsta, componentul elastic crește, iar microfibrilele descresc ca număr. Din nou intervin ratele modificate de sinteză, excreție și asamblare ale componentelor amcromoleculare din membrană. Alterarea concentrației calciului, depunerea de lipide și fragmentarea enzimatică apar corelate cu modificările cantitative ale ratelor amintite, iar semnificația lor patologică decurge din reînnoirea diminuată a componentelor membranelor elastice (119, 120).

Din această scurtă prezentare rezultă că senescența membranelor extracelulare poate fi disociată în doi factori principali: a) unul dependent de starea-

Scanned with OKEN Scanner

celulelor ce sintetizează macromoleculele componente; b) al doilea, reprezentînd consecința primului, se exprimă printr-o reînnoire redusă a membranelor, depuneri de lipide și calciu, depresie enzimatică și fenomene autoimune (119).

2.8. Biomembranele și alterarea acțiunii unor medicamente la vîrstnici

Vîrstnicii apelează mai frecvent la medic și, în consecință, la tratamentul medicamentos. În S.U.A., de exemplu, 31% din medicamente au fost prescrise în 1984 persoanelor în vîrstă, care reprezintă 11,7% din totalul populației (80). Rata reacțiilor adverse la medicamente este mult crescută în aceste cazuri, după aceeași statistică 20—25%. Una din exeplicațiile posibile ale fenomenului constă în alterarea interacțiunii receptori-medicamente. Este greu de formulat o concluzie fermă, datorită dificultăților în caracterizarea acestei interacțiuni. S-a postulat că efectul farmacologic mai pronunțat la vîrstnici, în raport cu tinerii, depinde de raporturile situsuri receptoare/ concentrația medicamentelor. O rațiune a acestei afirmații este faptul că numărul de receptori nu rămîne static, fiind reglat de numeroși factori, inclusiv diferite stări patologice și concentrația medicamentului în organism. Agoniștii și antagoniștii adrenergici, glucocorticoizii, hormonii tiroidieni, estrogenii și progesteronul, ischemia, hipertensiunea arterială, cardiopatiile cronice, hipertrofia cardiacă pot influența numărul de receptori celulari (96). Dacă o serie de receptori se modifică funcție de vîrstă, alții, ca alfa-adrenoreceptorii rămîn neschimbați. Astfel, acțiunea antihipertensivă produsă de clonidină și metildopa, mediată de alfa-adrenoreceptorii corticali, nu este afectată de vîrstă (134). Uneori, pentru același tip de receptor alterările din cadrul îmbătrînirii se exprimă doar în unele organe, în timp ce în alte zone din organism receptorii rămîn nemodificați. Astfel, receptorii colinergici din sistemul nervos central sînt în declin în ganglionii bazali, dar nu și în alte regiuni ale creierului (80). Structurile receptoare pot suferi, de asemenea, fenomenele de supersensibilizare și desensibilizare. De exemplu, alterările receptorilor insulinici în unele forme de rezistență la insulină și perturbarea acțiunii nitroglicerinei pot fi corelate cu aceste procese (148).

Există cercetări ample asupra receptorilor din creier pentru benzodiazepine ca și pentru unii receptori hormonali. Foarte frecvent au fost studiați receptorii beta-adrenergici, colinergici și pentru dopamină. Pacienții vîrstnici prezintă un răspuns redus la agoniștii beta-adrenergici și, dimpotrivă, un răspuns mai intens la antagoniștii beta-adrenergici (84). Descreșterea răspunsurilor la bronhodilatatoarele beta-adrenergice este semnificativă clinic. Pînă recent, s-a presupus că diferențele de răspuns beta-adrenergic erau determinate de alterările numărului de receptori și ale afinității acestora. Ipoteza era utilizată pentru a explica creșterea nivelului plasmatic de norepinefrină, corelat pozitiv cu vîrsta și cu rezistența cordului la răspunsul cronotrop, corelată de asemenea pozitiv cu vîrsta (84). Doza de izoprotenerol necesară pentru creșterea ratei bătăilor inimii cu 25 pe minut este de 6 ori mai mare la vîrstnici decît la tineri. Cercetări recente au demonstrat însă, absența scăderii și a modificărilor de afinitate a beta-receptorilor, ca și faptul că alterarea acțiunii beta-blocantelor la bătrîni ar decurge din scăderea nivelului de cAMP și a reducerii activității adenilatciclazei (2).

Scanned with OKEN Scanner

Efectele farmacologice ale agoniștilor colinergici cresc cu vîrsta, dar efectele antagoniștilor parasimpatici (de ex. atropina) sînt foarte puțin crescute la nivelul inimii la vîrstnici. Acțiunile benefice ale anticolinergicelor scad și au un caracter foarte variabil. Alterările receptorilor beta-adrenergici și colinergici induc împreună modificări ale controlului simpatic și parasimpatic al inimii cu variații ale răspunsului, la medicamentele autonome.

Cu vîrsta, depleția progresivă de dopamină din centrii extrapiramidali ai creierului sporește riscul inducerii prin medicamente a bolii Parkinson (80).

Așa cum am menționat anterior, alterările de la nivelul sistemului endocrin au beneficiat de cercetări aprofundate. Modificările hormonilor pancreatici și corticosuprarenali au ca rezultat scăderea cu vîrsta a toleranței la glucoză și creșterea susceptibilității la hipoglicemiile de origine medicamentoasă (80). O serie de vîrstnici prezintă o reducere a eliberării de insulină, în timp ce alții, așa cum am demostrat și noi, o descreștere a numărului de receptori specifici-pentru insulină și anomalii ale etapelor postreceptor de transmitere a informației hormonale. Descrește producerea de hormoni sexuali; la femeile vîrsnice scăderea estrogenilor a fost corelată cu incidența crescută a osteoporozei. Scăderea nivelului hormonilor tiroidieni face populația vîrstnică mai puțin sensibilă la efectele stimulării nervoase simpatice și la activarea receptorilor beta-adrenergici prin catecolamine și alte medicamente (fenilefrină, efedrină). Tot scăderea hormonilor tiroidieni induce la bătrîni o sensibilitate crescută la acțiunea digitalei și sporirea riscului la hipotermia de origine medicamentoasă (104).

Creșterea toxicității digitalei la vîrstnici a constituit subiectul unor cercetări extinse primele constatări fiind, în mod firesc, de ordin clinic (11). Extinderea investigațiilor la nivel molecular a fost favorizată intens de constatarea inhibării pompei de Na^+ și K^+ de către glicozizii cardiotonici digitala și ouabaïna (g-strofantină). Ulterior, s-a demonstrat că „pompa" este reprezentată de (Na^+, K^+)-ATP-ază, pentru ca în ultimii ani să se izoleze și purifice enzima. Ca urmare, s-a confirmat definitiv asocierea, la nivelul membranei plasmatice, a enzimei cu receptorii pentru glicozizii digitalici. Astfel, subunitatea catalitică a (Na^+, K^+)-ATP-azei, de 100 000 daltoni, prezintă pe fața citoplasmatică locurile de legare pentru Na^+ și ATP, iar pe fața externă locurile de legare pentru K^+ și ouabaïnă (a se vedea capit. IV). Digitala își exercită efectele terapeutice sau toxice prin intermediul acestei enzime, dar și prin intermediul sistemului nervos simpatic (112, 121).

Diferențele activității (Na^+,K^+)-ATP-azei funcție de vîrstă pot explica incidența crescută a intoxicațiilor cu digitală la pacienții bătrîni ca și a reacțiilor alergice, de asemenea, mai frecvente. Pe șobolani Fischer 344 s-a constatat o descreștere a activității (Na^+, K^+)-ATP-azice de la nivelul creierului între lunile 12 și 28 de vîrstă. Enzima de la nivelul inimii este mai rezistentă la inhibarea prin compușii digitalici, comparativ cu aceeași enzimă din creier sau măduva spinării (1). De aici se poate conchide că la tulburările de ritm produse de glicozizii cardiaci contribuie (Na^+,-K^+) ATP-aza din sistemul nervos central. Datele devin și mai convingătoare dacă menționăm că aceeași relație a fost detectată și la primatele nonumane. Enzima purificată din măduva spinală toracică provenind de la animalele în vîrstă de 4 ani era mai rezistentă la ouabaïnă decît cea provenind de la animale cu vîrsta între 10—20 ani (11). În tabelul II sînt prezentate aceste rezultate, I_{50} reprezentînd concentrația de ouabaïnă la care activitatea (Na^+, K^+)-ATP-azei se reduce la jumătate.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL II

Dependența de vîrstă a inhibiției de către ouabaină a activității (Na^+, K^+)-ATP-azei la maimuță (M. nemestrina) și la șobolan (Fischer 344)

(După S. I. Baskin și Z. V. Kendrick, 1978) (11)

Vîrsta (în ani)	M. nemestrina		Vîrsta (în luni)	Șobolan Fischer 344	
	N	I_{50}		N	I_{50}
			3	6	$1,02 \times 10^{-5}$
4	3	$3,37 \times 20^{-5}$	12	6	$2,10 \times 10^{-6}$
10	7	$1,15 \times 10^{-5}$	24	4	$1,03 \times 10^{-6}$
20	5	$5,50 \times 10^{-6}$	28	2	$8,40 \times 30^{-7}$

Numeroși factori pot influența toxicitatea glicozizilor cardiaci. Modificări ale mediului ionic alterează legarea medicamentului la nivelul enzimei. Este cazul reducerii potasiului, creșterii calciului și scăderii magneziului, alterări confirmate la șobolanii Fischer 344 senescenți (40).

Mult mai complexă este analiza efectelor unor medicamente psihotrope utilizate în tratamentul neuropsihiatric la vîrstnici. Astfel, o serie de neuroleptice cu proprietăți de „stabilizare a membranei" au fost evaluate clinic pe animale. Nu este încă clar dacă acestea ameliorează funcțiile celulare prin prevenirea deteriorărilor proceselor de membrană. Dimpotrivă altele, precum clorpromazina, pot altera funcțiile dependente de membrană, accelerînd astfel îmbătrînirea (143). Rezultă necesitatea prudenței în administrarea neurolepticelor la vîrstnici.

Medicamentele derivate din ergotamină (ca hiderginul) reduc perturbările activității electrice a creierului și ameliorează metabolizarea glucozei (W. Meier-Ruge, citat din 143), ceea ce presupune o asociere cu funcțiile membranei. Administrarea de hidergin ar impune un efect „stabilizator" al membranelor neuronale afectate de îmbătrînire. Un efect similar, de protecție al aceluiași medicament, a fost demonstrat în ingestia cronică de etanol, prin evitarea deteriorării mielinei.

Deosebit de interesante, deoarece se referă și la gerovital H_3, sînt o serie de rezultate obținute de G. A. Sun (prezentate în 143). În mod normal lizocompuși sînt formați în creier în cantități extrem de reduse. De aceea a fost investigat nivelul lizocompușilor în perioada senescenței și după tratament cronic medicamentos. În prezența CoA, ATP și Mg^{2+} acizii grași marcați sînt activați de acil-CoA-ligază și consecutiv, încorporați în fosfogliceridele din creier, prin intermediul lizofosfoglicerid-aciltransferazei. În cazul cînd în mixtura de incubare nu se adaugă lizofosfogliceride, activitatea de acilare reflectă nivelul lizocompușilor endogeni din țesutul cerebral. Ca urmare, dacă sinaptozomii sînt incubați cu (9,10—^{3}H)-palmitat și (1—^{14}C)-arachidonat acești acizi grași marcați vor fi încorporați în fosfogliceride, îndeosebi în diacil-glicerofosfoinozitoli (diacil-GPI) și în diacil-glicerofosfocoline (diacil-GPC). Rezultatele au arătat (tabelul III) creșterea încorporării acizilor grași în diacil-GPC, funcție de vîrsta animalelor, în timp ce legarea la diacil-GPI și diacil-glicerofosfoinozitoli (diacil-GPI) descrește cu vîrsta. În plus, raportul diacil-GPI și diacil-GPC scade dramatic odată cu creșterea vîrstei. Creșterea diacil-GPC marcat indică o acumulare de lizolecitină în țesutul cerebral Totodată, scăderea diacil-GPI și diacil-GPE marcați poate fi determinată de o descreștere a activității de acilare.

Scanned with OKEN Scanner

TABEL III

Incorporarea (^{3}H)-palmitatului și (^{14}C) arachidonatului în glicerolipidele sinaptozomilor la șoarece: variații funcție de vîrstă și de tratamentul cronic medicamentos
(După A. Y. Sun și G. Y. Sun, 1979) (143)

Vîrsta (luni)	PI	PC	PE	DG	TG
(^{3}H)-palmitat					
6 (n= 6	3.492	9.339	3.708	2.783	4.902
12 (n= 6)	2.503	8.647	3.076	2.342	5.012
25 (n= 6)	2.258	10.453	2.984	3.205	4.552
(^{14}C)-arachidonat					
6 (n= 6)	1.748	2.694	1.323	246	1.382
12 (n= 6)	1.394	2.475	1.259	252	1.272
25 (n= 4)	1.497	3.107	891	323	1.214
Tratament medicamentos:					
(^{3}H)-palmitat					
Control (n= 5)	2.149	7.464	4.001	4.034	2.001
CPZ (n= 7)	2.302	8.454	2.916	5.624	2.306
G (n= 4)	1.927	8.071	4.407	6.136	2.240
(^{14}C)-arachidonat					
Control (n= 5)	1.155	2.283	1.530	302	814
CPZ (n= 7)	1.280	2.687	1.040	395	812
GV (n= 4)	1.082	2.372	2.565	336	807

Notă: PI — diacil-glicerofosfoinozitol; PC — diacil-glicerofosfocoline; PE — diacil-glicerofosfetanolamine; DG — diacilgliceroli; TG — triacilgliceroli; CPZ — clorpromazină; GV — Gerovital H_3.

Cînd șoarecii au primit cronic doze de Gerovital H_3 și clorpromazină, rezultatele au indicat o creștere a acizilor marcați încorporați în diacil-GPC după tratamentul cu clopromazină, dar nu și după Gerovital H_3. Ambele medicamente produc o creștere a includerii palmitatului marcat în diacil-glicerol, comparativ cu lotul de control (tabelul III). Prin urmare, creșterea lizocompușilor, îndeosebi a lizolecitinei, observată în creierul senescent, poate fi amplificată de unele neuroleptice, ca clorpromazina. O serie de medicamente care pot restabili metabolismul lipidelor membranare prin stimularea *turnover*-ului și, deci, reduc lizocompușii din creier, ar putea avea o valoare terapeutică în tratamentul pe termen lung al dezordinilor geriatrice.

Este ușor de prevăzut că datele referitoare la modificările biomembranelor și în particular cele referitoare la receptorii specifici, vor influența tot mai mult, în sens pozitiv, optimizarea tratamentului medicamentos la persoanele în vîrstă. De asemenea, dacă ipoteza alterării lipidelor membranei în senescență va fi confirmată definitiv, se deschid perspective terapeutice de interes.

3. BIOMARCHERI AI ÎMBĂTRÎNIRII

Utilitatea biomarcherilor decurge din necesitatea cunoașterii gradului de îmbătrînire a unui organism, în diferite scopuri, de la pragmatismul extrem (al societăților de asigurare), pînă la domeniile practicii medicale și ale medicinii sociale. Concomitent, biomarcherii sînt indispensabili în cercetarea

Scanned with OKEN Scanner

fundamentală atît pentru orientarea programelor de lucru cît și în scopul validării rezultatelor.

Vîrsta sau trecerea timpului nu este, prin ea însăși, cauza proceselor care conduc la îmbătrînire, dar parametrul timp prezintă unele avantaje: a) este tradițional și ușor de înțeles; b) poate fi exprimat în unități recunoscute; c) poate fi determinat pentru fiecare subiect, funcție de data nașterii. S-a constatat însă, atît prin observații comune cît și prin teste că vîrsta cronologică nu este utilă în predicția performanțelor fiziologice ale organismului și, deci, în evaluarea gradului de îmbătrînire (137). Cu alte cuvinte, „rata de îmbătrînire" nu corespunde în mod necesar vîrstei cronologice, vîrsta fiziologică fiind incomparabil mai relevantă. Evaluarea vîrstei fiziologice reprezintă o preocupare frecventă în cercetarea gerontologică, inclusiv în cadrul Organizației Mondiale a Sănătății.

Rezultatele obținute prin abordarea la nivel molecular a proceselor de senescență influențează sensibil și conceptul de biomarcher. Astfel, este tot mai exprimată tendința stabilirii acestor marcheri de către marile laboratoare de cercetare din domeniul gerontologiei. În acest sens vom menționa biomarcherii propuși recent (1985) de „*National Institute of Aging*", Bethesda (140). Criteriile stabilirii unor marcheri utili au fost următoarele:

1) Biomarcherii să poată fi evaluați fără risc letal la animalele utilizate ca model, iar la om să nu producă nici o traumă, oricît de minimă. La animale (îndeosebi rozătoare) asemenea marcheri permit efectuarea mai multor teste pe același animal.

2) Biomarcherii trebuie să fie înalt reproductibili și să reflecte vîrsta fiziologică.

3) Funcțiile examinate să suporte modificări semnificative într-o perioadă scurtă de timp. Pentru rozătoare este ideal ca declinul să se producă semnificativ într-o perioadă de 3—6 luni, ceea ce permite o testare mai rapidă și mai extinsă. La om diferitele teste trebuie să fie aplicabile perioadelor specifice ale vieții umane.

4) Funcțiile clinice vor fi măsurate la om cu menținerea efectivă a sănătății și prevenirea bolilor (140).

Fără să reproducem toți acești biomarcheri, în număr de 21 la animalele de laborator și 29 pentru evaluarea senescenței umane, vom menționa că majoritatea sînt corelați indirect, sau direct cu biomembranele. Dintre aceștia, menționăm: rezistența neuronilor la injurii provocate, ATP-aza miofibrilară, receptorii dopaminergici (la animale), celule T imature, rezistența la insulină norepinefrina plasmatică, răspunsul cardiac la stimulare beta-adrenergică, racemizarea proteinelor (la om). Marcherii sînt utili deopotrivă în validarea rezultatelor cercetării, cît și în practica geriatrică. Unul dintre programele de cercetare în cadrul cărora se testează biomarcherii potențiali este intitulat „Alterări celulare și moleculare", confirmîndu-se astfel interesul particular pentru investigarea nivelurilor molecular și celular în îmbătrînire.

În ceea ce privește modelele animale utilizate, se conturează tendința consacrării gerbilului, rozător din familia Cricetidae originar din Mongolia, care prezintă o serie de atribute fiziologice și de comportament analoge cu cele de la om (25). Durata sa de viață (maximum 48 luni, dar în medie 35 luni), costul redus, inclusiv al întreținerii, omogenitatea genetică, prezența inclusiv

Scanned with OKEN Scanner

la animalele vîrstnice a unor surprinzătoare similitudini cu omul, au condus la calificarea acestui animal drept „model unic" în cercetarea îmbătrînirii (25).

*

Din datele prezentate anterior rezultă convingător implicarea membranei și a structurilor sale asociate în procesele de senescență. Ca un reflex al acestor rezultate, unii cercetători alătură teoria de membrană a îmbătrînirii la pletora de teorii biogerontologice. Această teorie, chiar dacă nu poate fi considerată ca exclusivă, exprimă faptul că membranele celulare reprezintă prin deteriorările pe care le-am menționat succint anterior, puncte critice de declanșare și evoluție ale proceselor de îmbătrînire. Abundența teoriilor este explicabilă. Ori de cîte ori se obțin date foarte semnificative, apare tendința trecerii lor pe primul plan în explicarea senescenței, pînă la elaborarea unei teorii. Pe de altă parte, multitudinea considerațiilor teoretice este generată de faptul că modificările din cadrul îmbătrînirii afectează toate componentele sistemelor vii, de la cel molecular pînă la organismul întreg. Aceste schimbări ierarhizate fac posibilă elaborarea unor teorii bazate pe evenimente la nivelul moleculelor, organitelor celulare, membranei, celulelor, țesuturilor, organelor și organismului în întregul său.

Dincolo de orice considerații teoretice, rămîne semnificativă consacrarea în cercetarea biogerontologică actuală a mijloacelor biologiei moleculare. Cînd datele vor deveni suficiente se va realiza, probabil, o convergență și deci o punere în acord a tuturor teoriilor.

Pentru medicină realizarea unui concept unic atotcuprinzător asupra senescenței are o importanță particulară, M. Glasser susținînd recent (1986) că înțelegerea proceselor de îmbătrînire va conduce spre o teorie unificată a bolilor, deoarece bolile vîrstnicilor domină procentual întreaga patologie (39).

Vom încheia cu cuvintele lui Claude Bernard, „Constanța mediului intern este condiția vieții independente", la care adăugăm pe cele ale unui reputat teoretician al gerontologiei contemporane, G. Sacher, „Inconstanța mediului intern este condiția sfîrșitului vieții" (129). La organismul îmbătrînit este evidentă dereglarea mecanismelor homeostazice. Alterările diverse ale biomembranelor, în particular datorate generării de radicali liberi cu peroxidarea consecutivă a lipidelor, declinul activității ADN, sursă de sinteză a unor proteine cu diferite grade de inabilități funcționale, dereglările consecutive ale receptorilor celulari se reflectă în mod particular la nivelul sistemelor nervos și imunitar. Dacă există un generator neuroendocrin al îmbătrînirii ori neuroimunitar, sau un alt „centru" morfofuncțional declanșator al acestui proces ireversibil sau dirijor al unui program preexistent, dacă senescența poate fi controlată prin dietă și terapeutică, vor răspunde în viitor puternicele centre contemporane de cercetare din domeniul biogerontologiei.

Bibliografie selectivă

1. ABDEL-LATIF A. A., YAMAGUCHI M., SMITH T. — Life Sci., 1968, 7, 1325.
2. ABRASS I. B., SCARPACE P. J. — J. Gerontol., 1981, 36, 298.
3. ADLIN E. V., KORENMANN S. G. — Ann. Intern. Med., 1980, 92, 429.
4. ASLAN A. — Therapiewoche, 1959, 8, 10.
5. AZENCOTT R., COURTOIS Y. — Exp. Cell Res., 1974, 36, 69.

Scanned with OKEN Scanner

6. BACH J.-F. — Transplant Rev., 1973, 16, 196.
7. BAHEMUKA M., HODKINSON H. M. — Age and Ageing., 1976, 5, 24.
8. BALDUINI C., BALDUINI C. L., ASCARI E. — Biochem. J., 1974, 140, 557.
9. BARCLAY M., BARCLAY R. K., SKIPSKI V. P., ESSNER E. S., TEREBUSKEKISH O. — Biochim. Biophys. Acta, 1972, 255, 931.
10. BARTOSZ G. — Biochim. Biopyhs. Acta., 1981, 664, 69.
11. BASKIN S. I., KENDRICK Z. V. — în *Aging*, vol. 6 (sub red. *G. Kalder, W. J. DiBattista)*, Raven Press., New York, 1978, pp. 141—158.
12. BEREGI E. — Mech. Ageing Dev., 1972, 1, 233.
13. BOCCI V. — Birt. J. Hemat., 1981, 48, 515.
14. BOOYSE F. M., ZSCHOCKE D., HOVEKE T. P., RAFLESON M. E. — J. Lab. Clin. Med., 1972, 79, 344.
15. BORKAN G. A., NORRIS A. H. — J. Geront., 1980, 35, 177.
16. BOROCHOV A., HALEVY A. M., SHINITZKY M. — Nature, 1976, 263, 158.
17. BUCKLAY C. E., DORSEY F. C. — J. Immunol., 1970, 105, 964.
18. BURCHINSKY S. G. — Exp. Gerontol., 1984, 19, 227.
19. BURICH R. L. — J. Gerontol., 1975, 30, 539.
20. BURNETT F. M. — Prog. Immunol., 1974, 5, 27.
21. CALDERINI G., TOFFANO G. — în *The Aging Brain: Cellular and Molecular Mechanisms in the Nervous System* (sub red. *E. Giacobini, G. Giacobini, G. Filogano, A. Vernadakis)*, Raven Press, New York, pp. 87—92.
22. CALLARD R. E., BASTEN A., BLADEN R. V. — Nature, 1979, 281, 218.
23. CALLARD R. E., FAZEKAS S. G. B., BASTEN A., McKENZIE I. F. C. — J. Immunol., 1980, 124, 52.
24. CARPENTIER J. L., PERRELET A., ORCI L. — C. R. Acad. Sci. (Paris.), 1976, 283 D, 1417.
25. CHEAL M. L. — Exp. Aging Res., 1986, 12, 3.
26. COHEN B. M., ZUBENKO G. S. — Life Sci, 1985, 37, 1403.
27. CRAMER F. — *Death-From Microscopic to Macroscopic Order*, în *Synergetics-From Microscopic to Macroscopic Order* (sub red. *E. Frehland)*, Springer-Verlag, 1984, pp. 220—228.
28. CUTLER R. G. — în *Intervention in the Aging Process, Part B: Basic Research and Preclinical Screening* (sub red. *Regelson, F. M. Sinex)*, Allan R. Liss, New York, 1983, pp. 69—144.
29. DANON D., MARIKOVSKY Y. — J. Lab. Clin. Med., 1964, 64, 668.
30. DAX E. M. — Rev. Biol. Res. Aging, 1985, 2, 315.
31. DOUBAL S. — Mech. Ageing Dev., 1982, 18, 339.
32. FARRAR J. J., LOUGHMAN B. E., NORDIN A. A. — J. Immunol., 1974, 112, 1244.
33. FELDMAN R. D., LIMBIRD L. E., NADEAU J., ROBERTSON D., WOOD A.J.J. — N. Engl. J. Med., 1984, 310, 815.
34. FINCH C. E. — Brain Res., 1973, 52, 261.
35. FREUND G., BROPHY III T. R., SCOTT J. D. — Exp. Geront., 1986, 21, 37.
36. GAJDOS A. — La Nouv. Presse Méd., 1975, 4, 2515.
37. GAMBERT S. R., DUTHIE E. H. jr. — J. Gerontol., 1983, 38, 23.
38. GAMBERT S. R., JNGBAR S. H., HAGEN T. C. — Endocrinology, 1981, 108, 27.
39. GLASSER M. — Med. Hypothesis, 1986, 20, 385.
40. GOLDBERG P. B., BASKIN S. I. — Fed. Proc., 1975, 34, 277.
41. GOOD P., WATSON D. — Expl. Geront., 1973, 8, 147.
42. GREENBERG L. H., WEISS B. — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1979, 211, 309.
43. GREGERMAN R. I., BIERMAN E. L. — în *Textbook of Endocrinology* (sub red. R. *H. Williams)*, W. B. Saunders, Philadelphia, 1981, pp. 1192—1212.
44. GRIFFITHS I. D., CARSON D. W. — Eur. J. Clin. Invest., 1979, 9, 239.
45. GRIGORESCU A. — *Receptorul endocrin*, Editura Academiei R. S. R., București, 1983.
46. GRIUNA L. S. — Gerontology, 1977, 23, 452.
47. HALLGREN H. M., YUNIS E. J. — J. Immunol., 1977, 118, 2004.
48. HARMAN D. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 7124.
49. HARMAN D. — Age, 1983, 6, 86.
50. HARMAN D. — Age, 1984, 7, 111.
51. HART R. W., TURTURRO A. — Rev. Biol. Res. Aging, 1983, 1, 5.
52. HART R. W., TURTURRO A. — Rev. Biol. Res. Aging, 1985, 2, 3.
53. HAYFLICK L. — în *Physiology and Cell Biology of Aging* (sub red. *A. Cherkin)*, Raven Press, New York, 1979, pp. 3—19.
54. HAYFLICK L. — Fed. Proc., 1979, 38, 1847.

Scanned with OKEN Scanner

X. Modificări ale biomembranelor în alcoolism

„Acțiunea moleculară a etanolului asupra biomembranelor a devenit subiectul unor intense investigații. Studii biofizice au arătat că etanolul determină dezordini ale membranei și perturbă organizarea structurală fină a lipidelor din membrană. În alcoolismul cronic, aceleași biomembrane dezvoltă o rezistență la efectele dezordinii. Din rezultatele a numeroase studii rezultă că acțiunile multiple ale etanolului sînt asociate cu modificări în sistemele enzimatice importante în expresia funcțională a membranelor".

G. Y. SUN, A. Y. SUN (1985)

Deși reprezintă unul dintre cei mai simpli compuși organici, alcoolul etilic sau etanolul exercită efecte profunde asupra organismului. Ingerat abuziv și cronic, sub forma variatelor băuturi alcoolice, el afectează mai multe organe și îndeosebi creierul, nervii periferici, inima, ficatul și mușchii, pe lîngă alterarea extrem de polimorfă a activității psihice și a comportamentului uman. Efectele se complică, deoarece băuturile conțin funcție de compoziție și secretul de fabricație, diverși congeneri (alcool amilic, acetaldehidă) toxici, de asemenea, prin ei înșiși (29). Prin aceste efecte, ca și prin frecvența sa, alcoolismul acut, dar în mod particular alcoolismul cronic, reprezintă o autentică problemă de sănătate publică, cu largi implicații sociale.

Dacă în ceea ce privește datele clasice clinice și de laborator, există foarte multe rezultate, atît asupra intoxicației alcoolice acute, cît și asupra etilismului cronic, cunoașterea modificărilor de la nivel molecular a devenit productivă abia în ultimii ani. Frecvent, cercetările anterioare s-au concentrat asupra relației dintre metaboliții etanolului, îndeosebi acetaldehida, și malnutriția produsă prin abuzul de alcool. Investigarea rolului acetaldehidei a culminat cu întrebarea lui N. G. Raskin: „Alcoolism sau acetaldehism?" (81).

Cunoașterea biomembranelor oferă și în cazul acțiunii alcoolului asupra organismului posibilității de explicare a unor procese care pînă acum au fost, în mare parte, abordate adesea global, fără cunoașterea precisă a suportului molecular. Datele pe care le prezentăm în continuare nu trebuie considerate exclusivist, ci doar drept argumente pentru implicarea, în proporții variabile, a unei structuri cu rol crucial în reglarea metabolismului celular, creșterii și realizării comunicării intercelulare. Pornind de la rezultatele obținute, în primul rînd de la efectul fluidizant al etanolului la nivelul membranei, cu consecințe certe îndeosebi asupra inserției colesterolului, unii autori au emis chiar o *ipoteză-teorie de membrană* în alcoolismul cronic (24, 33, 35, 37, 64, 66, 70, 71, 102, 106, 110, 113, 143). Teoriile și ipotezele ce le însoțesc sînt de obicei partizane, iar în explicarea acțiunii alcoolului există suficiente teorii. Ca urmare, evenimentele moleculare de la nivelul biomembranelor sînt utile, nu în măsura în care susțin o teorie, ci prin integrarea și corelarea lor

Scanned with OKEN Scanner

cu rezultatele certe de pînă acum. Medicii practicieni care vin în contact cu diversitatea extremă a expresiilor clinice pe care le poate îmbrăca etilismul cronic (9), acceptă mai greu datele obținute îndeosebi prin tehnicile sofisticate și uneori abstracte ale biofizicii și ale biologiei moleculare în general. Totuși, aceste date sînt una din premisele explicării, în perspectivă, a patogeniei alcoolismului acut și îndeosebi cronic.

Acțiunea primară a etanolului se exprimă la nivelul sistemului nervos central, unde această moleculă mică, cu un nivel redus de reactivitate chimică, produce o depresie a funcțiilor de neurotransmitere în starea de intoxicație acută. În intoxicația cronică se dezvoltă toleranța fizică. Membranele celulare reprezintă locul major de acțiune inițială a etanolului, al cărui efect este corelat direct, ca și în cazul anesteziceior, cu solubilitatea în faza lipidică a membranei. Deoarece este foarte solubil în apă, alcoolul etilic prezintă un efect anestezic slab, blocarea activității nervoase producîndu-se doar la concentrații mari. Ca și cele mai multe anestezice generale, alcoolul provoacă o depresiune a funcțiilor neuronale prin interferarea translocării cationilor de la nivelul membranei neuronale. Membrana plasmatică reprezintă însă, doar locul de inițiere a acțiunii, deoarece etanolul poate difuza prin membrane și consecutiv pătrunderii în celulă, să interacționeze cu organitele intracelulare. Celulele hepatice reprezintă sediul detoxifierii, dar cînd aceste mecanisme sînt saturate, alcoolul depășește bariera sanguină provocînd modificări metabolice complexe, care implică și procesele de membrană. Trebuie să observăm că dacă studiile asupra efectelor alcoolului la nivelul creierului și ficatului sînt extinse, aceleași efecte asupra altor organe au constituit obiectul unui număr relativ redus de lucrări, cu rezultatele contradictorii (9,29). Cercetarea modificărilor produse de etanol cu tehnicile și metodele actuale permite, după cum se vedea, relevarea unor mecanisme de bază care, deși nu sînt exclusive, permit o interpretare globală a etilismului ca boală.

În continuare, prezentăm o sinteză a datelor actuale referitoare la modificările induse de alcoolul etilic la nivelul biomembranelor și în mod deosebit la nivelul membranei neuronale. Explicarea acestor efecte este în mod necesar corelată cu rolul lipidelor în structura și funcțiile biomembranelor (a se vedea cap. III).

1. EFECTELE ETANOLULUI ASUPRA PROPRIETĂȚILOR LIPIDELOR DIN MEMBRANĂ

Etanolul acționează la nivelul dublului strat lipidic prin producerea unor perturbări la nivelul zonei hidrofobe a acestuia. Ca urmare, sînt afectate funcțional toate celelalte componente ale mozaicului fluid membranar: proteinele cu rol enzimatic, transportorii, sau canalele ionice, precum și receptorii celulari. Sînt posibile și modificări ale proteinelor prin efectul direct al etanolului (46, 82).

Ipoteza perturbării lipidice este susținută de un puternic suport de fapte experimentale obținute la nivel molecular: 1) la concentrații relevante farmacologic de etanol (<100 mM), au fost detectate dezordini ale membranei neuronale, atît prin spectrele obținute prin rezonanță electronică de spin, cît și prin polarizarea de fluorescență; 2) efectul etanolului este mai marcat la nivelul membranei neuronale, comparativ cu cele nonneuronale și cu mem-

Scanned with OKEN Scanner

branele artificiale; 3) acțiunea alcoolului etilic asupra ordonării lipidice a membranei poate fi atenuată sau crescută pe baza selecției genetice; 4) administrarea cronică de etanol reduce sensibilitatea membranei neuronale, sau a altor tipuri de biomembrane, la perturbările produse în cazul administrării acute; 5) este posibilă obținerea din anumite lipide neuronale, a unor membrane artificiale cu o sensibilitate deosebită la etanol (16, 17, 36, 43, 44, 79, 82, 91).

Rezultatele au fost confirmate de un număr mare de cercetători, dar există o serie de controverse de ordin metodologic. Astfel, se afirmă că efectele etanolului asupra ordonării membranei la concentrații farmacologice (< 100 mM) sînt reduse și ele echivalează cu acelea produse de variațiile temperaturii cu un grad. În plus, utilizarea marcherilor de spin produce prin ea însăși o serie de perturbări la nivelul biomembranelor. De aceea, o serie de cercetători au reexaminat efectele etanolului asupra matricei lipidice din membrană prin tehnici de rezonanță magnetică nucleară (48, 62). Deși nu este exclusă prezența unor artefacte, utilizarea RMN prezintă o serie de avantaje față de tehnicile cele mai întrebuințate pînă în prezent, RES și polarizarea de fluorescență (34, 63). În principiu, creșterea intensității spectrului RMN este asociată cu descreșterea ordinii lipidelor în membrană. Termenul de ordine (sau dezordine) este utilizat în sensul său general și se referă la mobilitatea lipidelor din membrană. O serie de cercetători susțin că deoarece mobilitatea în membranele naturale este expresia întîrzierii sau obstrucționării mișcărilor moleculelor lipidice, termenul de ordine rămîne cel mai adecvat (11, 48). Tehnicile RMN, deși sofisticate mai ales pe planul prelucrării și interpretării rezultatelor, ar reprezenta alternativa cea mai productivă în relevarea ordinii lipidelor din biomembrane.

Continuînd cu aspectele metodologice esențiale, faptul că intoxicația alcoolică poate fi reprodusă la mai multe animale reprezintă un avantaj. Recent s-a propus, însă, reevaluarea criteriilor de selecție a modelelor animale, care pînă nu de mult se efectuau în primul rînd pe baza preferințelor animalului pentru alcool (14,25). În mod deosebit trebuie cunoscute particularitățile structurale și funcționale ale biomembranelor, fără de care nu este posibilă o interpretare corectă a rezultatelor.

Un aspect dificil constă în relevarea concentrațiilor la care acțiunea etanolului este evidentă, ca și stabilirea unei relații certe între variațiile de concentrație și efectele la nivel molecular. De exemplu, în S.U.A. s-a stabilit ca nivel de concentrație 25 mM, ceea ce ar corespunde la o moleculă de etanol pentru 500 molecule lipidice din membrană (143).

Efectele etanolului asupra lipidelor de la nivelul membranei se obiectivează prin *modificarea unor parametri biofizici și biochimici.*

Modificări biofizice mai semnificative sînt următoarele: utilizîndu-se acizi grași cu marcheri de spin s-a constatat o descreștere a parametrilor care indică ordinea stratului bilipidic. Aceste rezultate arată că inserția alcoolului etilic în membrană este asociată cu creșterea mobilității lanțului acil, în același sens cu creșterea proporției de acizi grași nesaturați în membrană. Efectul de „fluidizare" a membranei este corelat cu lungimea lanțului alcoolilor alifatici. S-a demonstrat că membranele sinaptice izolate de la șoarecii supuși la efort răspund diferit la efectele fluidizante ale etanolului, modificările fiind mai pronunțate la speciile cu durata lungă a somnului decît la cele cu somnul scurt (36).

Scanned with OKEN Scanner

Etanolul exercită cea mai mare modificare a parametrilor de ordine ai membranei cînd se utilizează acid 12- și 16-doxilstearic cu marcheri de spin, în comparație cu acidul 5-doxilstearic (34). Această observație nu poate fi considerată o probă a inserției etanolului în regiunea atomilor de carbon 12-16 ai lanțului de acizi grași, deoarece mișcarea grupărilor fosfolipidice acil poate fi afectată și de alți factori, îndeosebi de către capetele polare ale fosfolipidelor, precum și de prezența colesterolului și a altor lipide. Proteinele pot, de asemenea, să afecteze mișcările grupărilor acil, prin interacțiunea cu grupările polare ale capului fosfolipidic (60). Pe de altă parte, s-a constatat că probele de acizi grași marcați pot constitui prin ele însele un factor perturbator, fenomen observat, de exemplu, la celulele EL4 (80). Aceasta înseamnă că interpretarea variațiilor parametrilor de ordine depinde și de tipul de molecule marcate utilizate (78, 106, 143).

Administrarea cronică de etanol va conduce la o rezistență la efectele constatate în intoxicația acută. În acest scop, s-a comparat gradul de perturbare a membranelor la animale cărora li s-a administrat cronic etanol, cu loturi de control. Se poate afirma că această adaptare înseamnă descoperirea unei forme noi de toleranță la substanțe toxice, ea fiind constatată în intoxicația cronică cu etanol și pentru alte tipuri de alcool, ceea ce sugerează o modificare globală persistentă a membranei. Faptul că fenomenele apar mult mai intens *in vitro* a creat o serie de controverse. (6, 24, 143).

O altă serie de rezultate au fost obținute prin tehnici de fluorescență, considerate de mulți cercetători preferabile studiilor RES. Frecvent a fost utilizată 1,6-difenilhexatriena (DPH), cunoscută ca sondă sensibilă la straturile hidrofobe ale membranei. La concentrații fiziologice, etanolul facilitează încorporarea DPH în membrana plasmatică sinaptică, rezultînd astfel o creștere a intensității fluorescenței (46). Măsurîndu-se polarizarea de fluorescență a DPH, inserată în membrane bilipidice obținute prin extracție din membrane sinaptice, de la șoarecii cu toleranță la alcool, au fost constatate de asemenea diferențe semnificative în raport cu un lot martor. S-a emis supoziția modificării diferiților parametri prin schimbări ale compoziției lipidelor din membrană (58).

În unele experimente au fost utilizate două tipuri de probe fluorescente, atît pentru suprafața membranară cît și pentru zona hidrofobă. Este foarte semnificativ că în acest caz au fost observate variații ale fluorescenței doar pentru substanța care corespunde zonei lipidice (45). Utilizînd 2-toluidinnaftalen sulfonatul (TNS) G.Y. Sun și colab. constată că, pe lîngă fluidizarea membranelor, concentrații mici de etanol (0,1-0,5%) produc formarea de complexe TNS-membrană cu o mare intensitate de fluorescență. De notat că TNS conține atît o zonă moleculară hidrofobă cît și una hidrofilă. Această observație indică facilitarea de către alcool a pătrunderii substanței fluorescente în membrană. Pe de altă parte, la concentrații mari de alcool fluorescența membranei descrește, ceea ce înseamnă reținerea moleculelor de TNS în afara matricei membranare datorită excesului de etanol de la acest nivel (105). La animalele cu toleranță pentru etanol efectul bifazic observat *in vitro* dispare, ceea ce indică faptul că membranele nu mai sînt sensibile la efectul fluidizant al alcoolului (106).

Un alt indicator semnificativ este coeficientul de partiție în membrană a substanțelor lipofile. Astfel, H. Rottenberg și colab. au măsurat partiția în stratul hidrofob a nitroxiddecanului (5N10) constatînd, prin utilizarea de

Scanned with OKEN Scanner

sonde fluorescente, că rezultatele se corelează cu parametrii de ordine membranară măsurați prin RES. Membranele obținute de la șobolan, după un consum îndelungat de etanol au prezentat o descreștere a capacității de legare a etanolului, anesteziceior și a altor molecule hidrofobe (89). Aceste membrane s-au dovedit mai rezistente *in vitro* atît la acțiunea de perturbare a etanolului cît și a halotanului. Este logic să se conchidă că alterarea proprietăților membranei poate fi, cel puțin în parte, responsabilă de toleranța și toleranța încrucișată dezvoltate în timpul administrării cronice de etanol.

În ultimul timp se observă o utilizare intensivă a tehnicilor RMN pentru reexaminarea efectelor etanolului asupra biomembranelor, în mod particular la nivelul membranei neuronale.

Conform probelor biofizice, din care au fost prezentate doar cîteva exemple rezultă că etanolul alterează *in vitro* dispunerea structurală a lipidelor iar printr-un mecanism de adaptare, administrarea cronică de etanol creează un grad de rezistență la aceste efecte. Prin aceste metode, însă, nu se poate releva care sînt tipurile de lipide alterate, limitare ce poate fi depășită prin cercetarea unor *caracteristici biochimice* ale membranei și în primul rînd a interacțiunii enzime-biomembrane. Din acest punct de vedere, enzimele ce intervin în transporturi de substanțe prin bariera membranară apar deosebit de sensibile la efectele etanolului *in vitro* (103). Astfel, G.Y. Sun și colab. demonstrează *in vitro* un efect bifazic al alcoolului asupra (Na^+, K^+) — ATP-azei din membranele sinaptice, constînd într-o intensificare a activității transportului activ de Na^+ la concentrații mici (0,1 — 0,5%) și într-o reducere a acestuia la concentrații mai mari de 1%. Creșterea vitezei transportului la concentrații mici este atribuită sporirii fluidității membranei, ca urmare a inserției etanolului în stratul bilipidic. Dimpotrivă, la concentrații mari de alcool s-ar produce o dezmembrare a dispunerii proteinelor membranare în raport cu lipidele, ceea ce ar conduce la o inhibiție a proceselor transmembranare. Este cu totul tentant și surprinzător să se constate că efectul bifazic al alcoolului asupra ATP-azei sinaptozomale poate fi bine corelat cu efectele ingestiei de alcool asupra comportamentului la om (106). Modificările activității (Na^+, K^+)-ATP-azei au fost depistate atît în consumul acut de etanol, cît și în cel cronic. După o doză de intoxicație (6 g/kgcorp) la șobolani, creșterea activității (Na^+, K^+)-ATP-azei sinaptozomale a fost observată la 2—3 ore de la administrare, ea persistînd pînă la 16 ore de la administrare (30, 31, 104). S-a constatat, de asemenea, o creștere similară în perioada de revenire, după o intoxicație acută, interpretată ca un tip de răspuns al enzimelor membranare, la acțiunea inhibitorie inițială a alcoolului.

Mai multe cercetări au indicat o creștere a (Na^+ K^+) —ATP-azei după administrarea cronică de alcool etilic ce poate fi bine corelată în timp cu dezvoltarea toleranței funcționale (10, 57). Întrucît enzimele membranare sînt intim asociate cu lipidele este logic să se considere că această creștere a activității enzimei după administrare cronică de etanol este consecința alterării lipidelor membranare.

Sensibilitatea enzimelor de la nivelul membranelor la modificările mediului înconjurător lipidic a fost probată prin examinarea dependenței de temperatură a activității enzimatice, în relație cu gradul de nesaturare a lanțurilor de acizi grași fosfolipidici. Această corelație poate fi demonstrată alterînd lanțurile respective printr-o dietă adecvată. Etanolul adăugat *in vitro* scade temperatura de tranziție a membranei și alterează energia de

Scanned with OKEN Scanner

activare a (Na^+ K^+) ATP-azei. Membranele sinaptice izolate de la animalele cu toleranţă la alcool, indică o modificare a temperaturii de tranziţie şi o descreştere a efectelor etanolului *in vitro*. Dezvoltarea acestui tip de hiposensibilitate pare să fie corelată cu gradul de toleranţă la toxic (73, 77, 83).

În mod analog cu cele descrise anterior, se observă un efect bifazic asupra fluxului de Na^+ dependent de influxul de Ca^{2+}. Totodată s-a constatat că inhibiţia influxului de Ca^{2+} prin etanol nu este dependentă de modificarea fluidităţii membranei. Recent (1984) s-a arătat că în cazul (Ca^{+2}, Mg^{2+})-ATP-azei de la nivelul reticulului sarcoplasmic fluiditatea membranară nu reprezintă un factor reglator important. În acest sens, a fost reconstituită enzima la nivelul unor straturi fosfolipidice duble, cu lanţuri de acizi graşi de diferite lungimi şi grade de nesaturare. Prin utilizarea acidului 5-doxilstearic conţinînd marcheri de spin, nu s-a observat nici o corelaţie între activitatea enzimei şi parametrii de ordine ai membranei (26, 108).

Un alt argument experimental în sensul celor prezentate anterior, îl constituie influenţa ingestiei de etanol asupra structurii şi funcţiei mitocondriilor. Astfel, s-a constatat că ingestia cronică de alcool diminuă activitatea specifică a citocrom-c-oxidazei. La aceleaşi mitocondrii hepatice după o ingestie prelungită de alcool, scade capacitatea de oxidare a grupului acetil, al acetilcarnitinei. Dimpotrivă, la 24 de ore oxidarea creşte şi persistă chiar peste 48 de ore. Se demonstrează astfel că mitocondriile au o capacitate redusă de oxidare a lanţurilor scurte de acizi graşi în cursul ingestiei de alcool şi o capacitate crescută după întreruperea ingestiei. Aceste rezultate, precum şi datele obţinute prin calorimetrie diferenţială, confirmă ipoteza că ingestia cronică de alcool induce schimbări adaptative în fluiditatea membranei mitocondriale din ficat. În plus, s-a demonstrat că după suprimarea alcoolului, membrana se adaptează la noile condiţii, ceea ce implică o modulare a structurii şi funcţiei membranelor şi demonstrează, totodată, rolul membranei în exprimarea toleranţei şi a dependenţei funcţionale de alcool (89, 92, 93, 101).

Din cele prezentate, rezultă că etanolul induce nu numai alterări ale proprietăţilor biofizice membranare, dar şi efecte structurale, modificînd activitatea unor enzime care controlează procese membranare importante.

2. MODIFICĂRI ALE COMPOZIŢIEI LIPIDELOR MEMBRANARE

Pornind de la rolul important al colesterolului în reglarea fluidităţii membranare, s-a presupus că acest component ar putea fi modificat în administrarea cronică de alcool etilic. J.H. Chin şi colab. au testat această ipoteză, constatînd o creştere a conţinutului în colesterol în membrana eritrocitară la şoarecele DBA/2, după administrarea cronică de alcool. Creşterea a fost atribuită accelerării transferului de colesterol către hematii, prin intermediul lipoproteinelor plasmatice (17). Sporirea conţinutului eritrocitar de colesterol ar putea fi un răspuns pasiv la creşterea colesterolului seric, consecutiv tratamentului cronic cu etanol la animale şi la om (38, 67, 115). Procesul este foarte activ în plasmă, dar nu se ştie încă dacă şi alte ţesuturi răspund în mod similar la regimul cu alcool etilic. De exemplu, administrarea de etanol timp de 5 luni, la şobolani de rasa Sprague-Dawley, nu a produs modificarea raportului colesterol/fosfolipide în omogenatele sau în fracţiunile subcelulare de

Scanned with OKEN Scanner

creier, aceeaşi constatare rezultînd şi din analiza raportului pe membranele celulare hepatice (2, 4, 54).

Aşa cum am menţionat anterior, efectul fluidizant al etanolului asupra membranelor este mai pronunţat la şoarecii cu durata lungă a somnului în raport cu speciile cu somnul scurt. Această diferenţă se menţine şi în cazul raportului colesterol/fosfolipide, care creşte la şoarecii cu somnul lung. Efortul prelungit sporeşte concentraţia colesterolului, ceea ce înseamnă o sensibilitate la acţiunea alcoolului. Totuşi, rezultatele obţinute sînt uneori contradictorii (36, 97, 98).

De interes sînt lucrările lui D. A. Johnson şi colab. care au utilizat DPH pentru măsurări de fluorescenţă, pe membrane reconstituite provenind de la un lot de şoareci cu toleranţă la alcool şi un altul de control şi nu au constatat nici o diferenţă. Aceste investigaţii conduc la concluzia că, spre deosebire de determinismul cert al colesterolului în proprietăţile biofizice globale ale membranelor, modificările reduse cauzate de administrarea cronică de alcool nu reprezintă un determinant major în mecanismul de adaptare exprimat prin toleranţa la etanol (59).

Un interes deosebit prezintă examinarea conţinutului membranelor neuronale în acizi graşi, deoarece unele enzime sînt afectate nu numai prin modificările fluidităţii dar şi funcţie de tipul de grupări acil cu care sînt esterificate fosfolipidele. Acest fenomen a fost demonstrat, de exemplu, pentru transmiterea sinaptică. Ipotetic, în intoxicaţia cronică va creşte proporţia de forme saturate ale acizilor graşi pentru a crea o rezistenţă la efectul perturbator iniţial. Faptele experimentale nu confirmă suficient această supoziţie. Totuşi, J. M. Littleton şi G. John cu constatat primii o descreştere a acizilor graşi nesaturaţi din fosfolipidele sinaptozomale la şoarecii supuşi la vapori de alcool, iar R.A. Harris observă efecte similare în tratamentul cronic cu etanol (46, 70, 71). Numeroase alte rezultate pun la îndoială alterări detectabile în grupările acil fosfolipidice din membranele sinaptice (5, 90, 107). Dimpotrivă, membranele mielinice se pot degrada consecutiv ingestiei prelungite de alcool. Astfel, la alcoolicii cronici cu semne clinice de degenerare hepatică şi cerebrală au fost constatate reduceri ale lipidelor pînă la demielinizare. C. Alling şi K. Bostrom au arătat că afectarea prin etanol este maximă la nivelul corpilor mamilari (2).

Modificările conţinutului membranar în acizi graşi au fost mai clar demonstrate în ţesuturi extraneuronale, îndeosebi la nivelul membranelor hepatocitelor. În cazul unei doze acute de alcool etilic au fost detectate, chiar după 6 ore, modificări ale conţinutului în acizi graşi în mitocondrii şi microzomi. Rezultatele se confirmă şi la maimuţă, un model experimental mai adecvat, (21). Ingestia de etanol a afectat compoziţia grupurilor acil în mitocondriile suprarenalei de cobai, dar ca şi în alte cazuri s-a observat creşterea proporţiei unor tipuri de acizi graşi şi scăderea altora, de exemplu, a crescut proporţia de acid linoleic şi a scăzut cea de acid arachidonic (70).

S-a încercat şi stabilirea unei corelţii între profilul acizilor graşi şi cel al fosfolipidelor serice, acesta din urmă fiind modificat de dietă ori în cadrul unor afecţiuni hepatice. Astfel, C. Alling şi colab. au constatat o serioasă descreştere a acidului linoleic în fosfatidilcolina serică şi a colesterolului esterificat la pacienţii etilici care au consumat alcool în exces cu 10—30 zile înainte de internare. Nivelul acidului linoleic revine la normal după abstinenţă. Circa 80% dintre alcoolici prezintă modificări în profilul acizilor graşi din fosfatidil-

Scanned with OKEN Scanner

colină, constatare comparabilă cu alterările din afecțiunile hepatice de origine nealcoolică, ceea ce a condus la ideea că acest tip de analiză poate fi util explicării modificărilor din etilismul cronic (3). Într-un studiu recent s-a constatat descreșterea acizilor linoleic și arachidonic pe biopsiile hepatice recoltate de la un grup de etilici cronici (15). Aceste variații depind decisiv de obiceiurile alimentare, care trebuie luate în considerare înainte de a ajunge la concluzii ferme. Faptul a fost confirmat pe porcii pitici la care, prin dietă controlată conținînd 24% proteine și 2—3 grăsimi, s-a observat o descreștere accentuată a conținutului în acid linoleic din fosfatidilcolină și triacilgliceroli după 2 săptămîni de consum de alcool. Totodată după suprimarea etanolului modificările dispar rapid. Examinarea biopsiilor hepatice conduce la o corelație semnificativă între modificările lipidelor din microzomii hepatici și cele din serul sanguin (30).

Este logic ca alterările prelungite ale lipidelor serice să conducă la modificări ale conținutului lipidic la nivelul membranei eritrocitare, fapt constatat experimental. Astfel, modificările lipidelor din membrana hematiei sînt similare cu cele din probele de ser sanguin, dar normalizarea după suprimarea etanolului se produce mai lent în eritrocite decît în ser (70). Aceste rezultate probează modificări adaptative la nivelul biomembranelor, pentru compensarea efectelor fluidizante ale alcoolului etilic.

De un interes deosebit este determinarea directă a fosfolipidelor membranare după ingestia de etanol, ea depinzînd de posibilitatea izolării unor membrane purificate, ca și de extracția și separarea componentelor lipidice individuale. În acest sens, s-a pus în evidență în mai multe cercetări o creștere a conținutului în plasmalogen (un glicerofosfolipid, denumit și plasmeniletanolamină). Astfel, s-a observat la etilicii cronici o descreștere a nivelului plasmalogenului în vermisul superior, dar nu și în emisferele cerebrale. Deoarece acest glicerofosfolipid este foarte concentrat în mod normal în mielină, scăderea indică o degenerare a structurilor mielinice. Creșterea plasmalogenului a fost constatată și în mitocondriile miocardului. Modificarea poate contribui la creșterea rigidității membranei (4).

O surpriză o constituie creșterea fosfatidilserinei pusă în evidență la cobai tratați cronic cu etanol (107) în fracțiunile membranare sinaptice și nonsinaptice. Se poate explica astfel, creșterea activității (Na^+,K^+)-ATP-azei, fosfolipidul respectiv fiind important și în medierea fosforilării proteinelor solubile Ca^{2+}-dependente, a interacțiunilor ligand-receptor, stimulării activității tirozinhidroxilazei, captării acidului aminobutiric și a sintezei de acetilcolină. În consecință, creșterea acestor fosfolipide consecutivă etanolului poate constitui un argument în explicarea modificărilor activității neuronale în legătură cu dezvoltarea fenomenului de toleranță.

Un alt component lipidic investigat îl reprezintă gangliozidele membranare cu rol important în dezvoltarea și regenerarea neuronală, a căror concentrație este evaluată prin determinarea acidului sialic. S-a observat o descreștere cu 20% a nivelului acidului sialic din creier la șobolanii tratați cu etanol (72). Rezultatele obținute pînă în prezent nu sînt edificatoare. Recent, M. Massarotti, sintetizînd datele obținute în mai multe laboratoare, a arătat că administrarea de gangliozide poate fi utilizată în tratamentul neuropatiilor de origine etilică (100).

Scanned with OKEN Scanner

3. EFECTELE ALCOOLULUI ASUPRA MEMBRANELOR NEURONALE

În mod normal, membranele neuronale sînt ţinta principală a studiilor asupra efectelor moleculare ale alcoolului etilic. De aceea, în prezent este posibil un tablou suficient de coerent al acestor modificări.

Nu se poate afirma cu argumente sigure o „preferinţă" a etanolului pentru celulele neuronale, dar cu certitudine efectele alcoolului asupra acestora sînt cele mai importante prin anvergura şi diversitatea lor.

Asemenea tuturor celorlalte membrane şi cea neuronală constă dintr-un strat dublu lipidic în care sînt inserate proteinele. În investigarea efectelor alcoolului asupra proceselor neuronale se acordă o semnificaţie particulară proteinelor, în scopul elucidării efectelor alcoolului asupra enzimelor legate de membrană şi asupra receptorilor (49, 50, 52, 66, 109). Funcţia esenţială a neuronilor este transmiterea informaţiei, facilitată deopotrivă de sisteme de transport membranar la nivelul neuronului şi de sisteme de transfer de la un neuron la altul. Cel mai important sistem de transport de la nivelul membranei este (Na^+,K^+)-ATP-aza, iar o enzimă foarte importantă din lanţul de transmitere a informaţiei este adenilatciclaza dopamin-dependentă, cuplată cu receptorul specific pentru dopamină. Pentru ambele enzime modificările produse de etanol sînt evidente (114).

Un subiect de interes deosebit constă în investigarea efectului alcoolului asupra producerii, eliberării şi nivelului neuromediatorului. Pe primul plan se situează rolul dopaminei în „efectul de întărire" al etanolului, raportat de mai mulţi autori (27, 50, 51, 68, 69, 110, 112). S-a constatat, de asemenea, o corelare între reglarea receptorilor dopaminici şi opiaţi la nivelul ariilor din creier bogate în dopamină (8). S-a încercat, de asemenea, pornind de la relaţia dintre alcool şi peptidele endogene opioide, studiul receptorilor pentru opiaţi, aparţinînd sistemului endorfinergic (18, 53).

Un aspect care complică interpretarea datelor îl reprezintă diferenţele genetice, exprimate la nivelul structurii şi funcţiilor biomembranare. Aceste deosebiri pot fi responsabile de diferenţe în sensibilitatea faţă de acţiunea iniţială a alcoolului etilic. De asemenea ulterior apar variaţii avînd aceeaşi cauză, în dezvoltarea toleranţei funcţionale. În mai multe experimente efectuate pe membrane de origine animală, au fost detectate reacţii la etanol care pot fi considerate drept o expresie a diferenţelor genetice (18,70, 86, 88).

Cu aceste menţiuni, ipoteza de membrană, sau mai realist, rolul membranelor în expresia acţiunilor etanolului este conturat destul de clar (17, 24, 55, 101, 102, 142). Astfel, este evident că alcoolul afectează sistemul nervos printr-o acţiune primară directă asupra membranelor excitabile neuronale. Acţiunea etanolului este, ca şi în cazul multor anestezice, nespecifică, producîndu-se ca urmare a unor modificări iniţiale ale biomembranelor de ordin biofizic. Astfel, moleculele de alcool etilic inserate la nivelul dublului strat lipidic, alterează mobilitatea laterală a lipidelor sau interacţionează cu porţiunile hidrofobe ale proteinelor intrinseci membranare, rezultînd modificări sterice. Efectul etanolului a fost explicat prin ipotezele Overton-Meyer, conform cărora există o corelaţie între solubilitatea lipidică a compuşilor anestezici, inclusiv a alcoolilor alifatici, şi potenţele acestor compuşi de a suprima o serie de funcţii biologice. Etanolul inhibă activitatea (Na^+, K^+)-ATP-azei, ca şi a altor enzime de la nivelul membranei, cu excepţia acetilcolinesterazei (102).

Scanned with OKEN Scanner

Consecințele majore ale interacțiunii etanol-biomembrane neuronale sînt următoarele: a) expansiunea membranei; b) fluidizarea membranei; c) dezorganizarea lipidelor; d) modificările conformaționale ale proteinelor.

a) *Expansiunea membranei* la concentrații ale etanolului cu efect blocant la nivelul fibrelor nervoase este de 2—3%. Creșterea de volum a membranei este de circa 10 ori mai mare decît volumul moleculelor de alcool încorporate în membrană. Totodată, această amplificare nu a fost observată pe lipozomii în care lipsesc proteinele. De aceea, expandarea membranei de către etanol ar putea fi explicată prin perturbarea matricei lipidice, care induce la rîndul său „o desfacere" a conformațiilor spațiale ale proteinelor. Perturbarea structurii proteinelor poate afecta intens interacțiunile lipide-proteine din membrană. Deoarece acestea sînt foarte importante în modularea activităților catalitice dependente de membrană, acțiunea etanolului depinde în mare măsură de afectarea relațiilor lipide-proteine. În cazul membranei neuronale vor rezulta, ca o expresie a acestor perturbări, efectul anestezic și modificările comportamentului uman (102).

b) *Fluidificarea membranei* a fost relevată în cazul anesteziccelor, incluzînd alcooli alifatici, pe modele de membrană lipidice. Dat fiind că activitatea enzimelor de la nivelul membranei este în relație cu starea biofizică a lipidelor, fluidificarea membranei prin acțiunea etanolului poate fi acompaniată de o serie de schimbări conformaționale în proximitatea sau la nivelul situsurilor active ale proteinelor dependente de membrană. Membranele, provenind de la șoareci de diferite rase, tratați pe termen lung cu etanol, au dovedit o rezistență la efectul fluidificant al toxicului. Prezența continuă a agentului fludificant probează un răspuns adaptativ, exprimat prin modificări ale structurii și funcției membranei (102).

c) *Dezorganizarea lipidelor* apare ca un proces bifazic. La concentrații mici, alcoolul etilic intensifică transportul de Ca^{2+} și activitatea (Na^+, K^+)-ATP-azei, probabil, datorită creșterii fluidității membranei. Dimpotrivă, la concentrații mari etanolul poate provoca dezorganizarea lipidelor și disrupția interacțiunilor proteine-lipide din membrane (102). (Fig. 1).

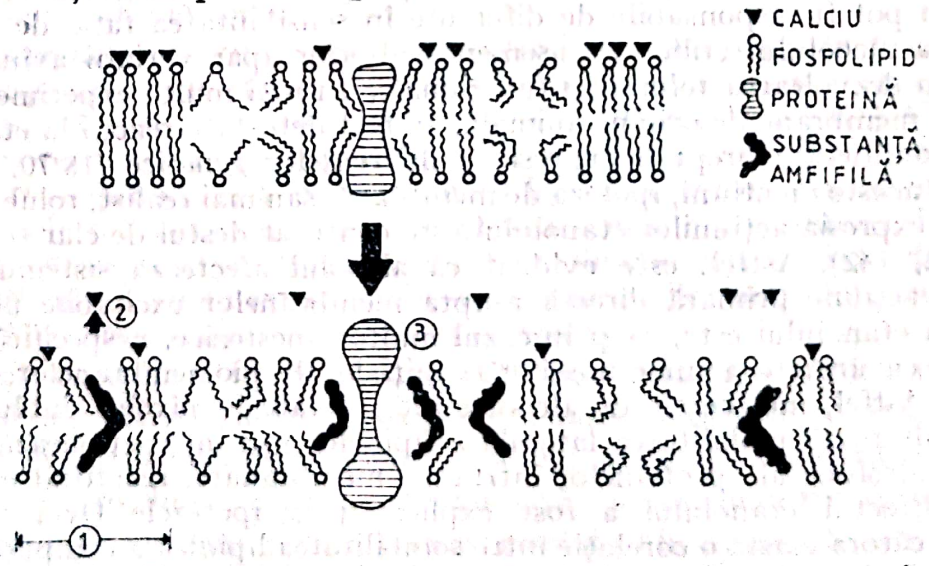


Fig. X. 1 — Reprezentarea celor 3 mecanisme prin care încorporarea moleculelor amfifile la nivelul fosfolipidelor membranare poate modifica funcțiile membranei: 1 — expansiunea membranei; 2 — deplasarea Ca^{2+}; 3 — disrupția membranei.

Scanned with OKEN Scanner

d) *Modificările conformaționale ale proteinelor* sînt caracteristice pentru fiecare specie de proteină și se află în relație strînsă cu activitatea biochimică. Se știe că menținerea conformației proteinelor din membrană se realizează prin legături hidrofobe și de hidrogen, depinzînd de mediul lipidic hidrofob. Au fost demonstrate *in vitro* modificări ale conformației proteinelor, determinate de etanol, care incorporat în membrană poate deveni o cauză de alterare permanentă.

În sinteză, răspunsul bifazic al membranelor la acțiunea etanolului, permite observarea unui paralelism cu manifestările comportamentale după ingestia de alcool. Astfel, la concentrații mici (sub 0,5%) este posibil ca etanolul să crească fluiditatea membranelor, facilitînd astfel procesele de transport, pe cînd la concentrații mari (1—4%) etanolul produce dezorganizarea lipidelor, disrupția interacțiunilor lipide-proteine și alterarea conformației proteinelor din membrană, ceea ce influențează profund funcțiile biomembranelor (102).

În afara acestor constatări suficient de clare există însă o serie de aspecte care impun dubii, sau sînt controversate. Astfel, se afirmă că toleranța și dependența la alcool se exprimă prin modificări ale matricei lipidice. Experimente efectuate pe celule variate provenind de la șoareci cu sensibilitate diferită la alcool, au evidențiat dobîndirea unei dependențe, exprimată prin simpotome severe apărute la suprimarea toxicului. Totuși, în absența etanolului membranele izolate *in vitro* nu diferă față de loturile de control. De asemenea, în membrană nu sînt detectate modificări observabile care să confirme dependența fizică de alcool. Astfel, dacă toleranța mărită a fost stabilită atît *in vitro* cît și *in vivo*, dependența a fost demonstrată doar *in vivo* (37).

Această discrepanță a stimulat o serie întreagă de cercetări. Toleranța și dependența fizică de alcool, reprezintă, în opinia lui D. B. Goldstein, două procese adaptative. Conceptual se leagă în mod inextricabil cele două fenomene. În realitate ele pot prezenta mecanisme diferite, dar sînt foarte greu de disociat experimental. Disocierea a fost reușită doar la șoarecele tratat cu 6-hidroxidopamină, la care dependența se poate dezvolta fără toleranță. Modificările din compoziția lipidică a membranelor, pot explica într-o măsură toleranța, deoarece constatarea creșterii colesterolului este un argument pentru o rezistență (o toleranță) mai mare a membranelor la efectele fluidizante ale alcoolului. Dependența, însă, este un răspuns farmacologic, care trebuie examinat, ca și în cazul medicamentelor ce pot crea o stare de dependență, funcție de durată, doză și prin intermediul unor mecanisme specifice (33). Deocamdată, pentru evaluarea gradului de dependență se încearcă doar cuantificarea semnelor clinice obiective care apar la etilici cronici după suprimarea consumului de alcool. Sindroamele de abstinență apar în decursul a cîtorva zile și sînt alcătuite dintr-o serie de semne obiective bine structurate, care prin expresia lor sugerează responsabilitatea unor mecanisme neuronale. Se presupune că dependența ar putea apărea ca o adaptare secundară la o serie de substanțe acumulate în decursul intoxicației (114).

O serie de cercetători, în primul rînd D. H. Ross și colab., au tentat să explice acțiunea etanolului și în particular modificările variabile ale membranelor condiționate genetic, prin analiza rolului calciului (84, 86, 88). Prezența cationului la nivelul membranei este un determinant major al unor procese dependente de membrană ca fluxurile de ioni, eliberarea neurotransmițătorilor și activitatea unor enzime. Calciul antrenează rigidizarea membranei și creș-

Scanned with OKEN Scanner

terea parametrilor de ordine, de aceea se poate afirma că acționează ca protector împotriva acțiunii de fluidizare a etanolului. Prezumpția este probată de faptul că la celulele tratate cu etanol, *in vitro*, se constată o deplasare a Ca^{2+} intracelular la nivelul membranei, iar capacitatea de fixare a $^{45}Ca^{2+}$ de către celule crește. Această scădere a calciului stocat explică inhibarea eliberării acetilcolinei și creșterea acumulării sale celulare, detectată pe secțiunile de creier (85). Etanolul, împreună cu neurolepticele, barbituricele ori alte anestezice, crește spontan eliberarea neurotransmițătorilor și alterează legarea Ca^{2+} la nivelul membranelor. Nu se cunosc încă bine consecințele acestei deplasări. În acest scop s-a cercetat capacitatea de legare a Ca^{2+} pe receptorii membranelor sinaptice, înainte și după expunerea acută la etanol la 3 rase de șoareci: C57, DBA și ICR. Înainte de tratarea cu etanol s-au constatat diferențe semnificative, în particular între membranele sinaptice provenind de la rasele DBA și C57. Astfel, legarea Ca^{2+} la membrane a fost cu 40% mai mică decît la șoarecii DBA față de șoarecii C57. Diferențele de legare în raport cu șoarecii ICR au fost de 25% în plus pentru C57 și de 18% în minus pentru DBA (85). Există, deci, serioase diferențe genetice în funcțiile biomembranelor, care se exprimă și în răspunsul acestora, la acțiunea etanolului. Astfel, în expunerea acută la alcool legarea Ca^{2+} pe receptori este mai pronunțată în cazul rasei DBA, cu un efect mai redus la ICR, cea mai redusă legare corespunzînd rasei C57. Creșterea legării Ca^{2+} indusă de etanol a fost de 57% la DBA, 29% la ICR și 18% la C57. Din rezultatele enumerate rezultă că șoarecii C57 au disponibilitățile cele mai mari de toleranță la efectele etanolului. Aceasta datorită sistemului celular propriu de care dispun cu care pot ajusta fluxul de Ca^{2+} în condițiile unui schimb crescut (85).

Diferențele genetice constatate permit o selecție a modelelor animale, dar complică deopotrivă interpretarea datelor experimentale.

Un aspect care tinde, după mult investigata modificare a lipidelor, să ocupe un loc central în studiul molecular al alcoolismului constă în cunoașterea alterărilor *enzimelor de la nivelul biomembranelor*. Unul din cercetătorii cei mai activi, B. Tabakoff afirma recent că ipoteza de membrană este promițătoare pentru înțelegerea, deopotrivă, a efectelor acute și cronice ale etanolului. Ipoteza va trebui însă complicată și extinsă pentru a înțelege nu numai modul în care etanolul afectează lipidele membranei neuronale, dar și în direcția înțelegerii modului cum aceste modificări ale lipidelor alterează funcțiile proteinelor din membrană. Cercetarea trebuie să clarifice efectele disrupției provocate de etanol asupra funcțiilor de conducere și transmitere din creier, ceea ce va crea în viitor o bază serioasă pentru tratarea și prevenirea alcoolismului (111, 112). De fapt, această direcție de cercetare s-a conturat de mai multă vreme, o serie de lucrări conținînd rezultate asupra modificărilor (Na^+, K^+)—ATP-azei neuronale și a adenilatciclazei asociate transmiterii informației specifice dopaminei (28, 39, 40, 61, 66, 94, 110, 116). (Na^+,K^+)-ATP-aza, integrată în membrana neuronală, poate fi afectată de etanol direct, sau prin perturbarea zonelor lipidice vecine tetramerului proteic. Mai mulți autori au indicat o creștere a activității (Na^+,K^+)-ATP-azei în administrarea cronică de etanol, interpretată ca un răspuns compensator (toleranță) la inhibiția inițială a activității enzimei. Creșterea a fost demonstrată la șoareci expuși cronic la vapori de etanol. Totodată, ATP-aza obținută din creierul animalelor la care alcoolul a fost suprimat s-a dovedit rezistentă la inhibiția prin etanol.

Scanned with OKEN Scanner

Efectele etanolului asupra conductanței ionice și potențialului membranei au îndreptat investigațiile spre mecanismele care mențin polarizarea membranei. La concentrații mari de etanol (500 mM) și de acetaldehidă (10—40 mM) se produce o inhibiție a (Na^+,K^+)-ATP-azei din creier. Administrarea cronică duce la o creștere compensatorie a activității (Na^+,K^+)-ATP-azei în microzomii din creier. Această creștere a fost demonstrată la șobolan și în unele arii corticale la pisică (66, 117).

În ceea ce privește adenilatciclaza, rezultatele mai importante sînt următoarele: modificările adenilatciclazei stimulate de dopamină nu sînt evidente imediat după suprimarea alcoolului, cînd animalele sînt încă intoxicate, dar ele apar la 8 ore de la întrerupere, cînd alcoolul a fost eliminat iar animalele prezintă semne de abstinență. La 24 ore, adenilatciclaza apare semnificativ redusă și rămîne ca atare timp de 3 zile, revenind la normal, în raport cu lotul de control, după 7 zile. Alterările funcției receptorilor specifici dopaminei apar deci paralele cu simptomatologia sindromului de abstinență. Este logic să se presupună că asemenea alterări ar putea constitui baza obiectivă a tulburărilor consecutive suprimării alcoolului etilic. Este interesant că în țesuturi, provenind de la animale la care alcoolul a fost suprimat de 24 ore, omogenizate și puse în contact cu 50 mM etanol, stimularea activității enzimei a fost egală cu cea din omogenatele provenind de la animalele martor. Aceasta demonstrează existența unui sistem biochimic dependent de prezența etanolului (110).

Pentru explicarea transmiterii mesajului de la receptor la enzimă a fost propusă implicarea mai multor factori. Astfel, s-a demonstrat existența unei proteine activator care leagă Ca^{2+}, localizată în membranele fracțiunilor sinaptozomale. Eliberarea sa în citosol se produce prin fosforilarea locului de legare de către proteinchinaza 3',5'-monofosfat dependentă. Descreșterea conținutului membranei în activator reduce activarea prin dopamină a adenilatciclazei striate, fără afectarea activității bazale. S-a arătat că o creștere a activatorului în membrană este asociată cu hipersensibilizarea receptorului pentru dopamină. Scăderea conținutului membranar de activator ar putea fi cauza descreșterii activității adenilatciclazei observate după întreruperea administrării cronice de alcool. Abilitatea etanolului adăugat *in vitro* de a inversa descreșterea sensibilității dopaminei, militează de asemenea pentru rolul cheie al activatorului dependent de Ca^{2+} în acest sistem. Totodată, nivelul cAMP este crescut în subcortex la un anumit timp după întreruperea etanolului, iar creșterea ar putea fi teoretic cauzată de sporirea translocării proteinei activator din membrană în citosol. Adiția de etanol *in vitro* nu este capabilă să restaureze conținutul membranei în proteină activator (110).

Alți autori afirmă că efectele etanolului asupra sistemului de mesageri secunzi, îndeosebi cAMP, după tratamentul cu alcool nu este egal în diferite arii ale creierului. În cortex și cerebel, nivelurile cAMP scad la 54% și, respectiv, cu 59% față de lotul de control după 12 ore de la administrarea etanolului. La nivelul punții medulare, același cAMP scade la 58% după numai 3 ore. În mezencefal reducerea este nesemnificativă, chiar după 48 de ore. Declinul cAMP nu poate explica efectul direct al etanolului asupra adenilatciclazei, care este determinat de scăderea concentrației de neurotransmițători. Adaptarea sistemului adenilatciclază /cAMP nu este deci un eveniment primar, necesar în crearea dependenței pentru etanol. Există doar posibilita-

Scanned with OKEN Scanner

tea ca acest sistem să contribuie la comportamentul din abstinență, indusă după o perioadă lungă de administrare a alcoolului etilic (95).

Mai multe studii se referă la influența etanolului asupra neurotransmițătorilor, dar rezultatele sînt contradictorii (56). Nu există nici un dubiu asupra faptului că măsurarea concentrației neurotransmițătorilor și a reînnoirii acestora reprezintă cea mai importantă probă a activității neuronale (114). Date mai certe au fost obținute doar în cazul norepinefrinei, care în cazul administrării acute de etanol variază bifazic, o creștere urmată de o scădere. În consumul cronic de etanol circuitul și reînnoirea epinefrinei se amplifică (114).

Pentru serotonină și dopamină rezultatele sînt foarte diferite, funcție de autori. Se speră o clarificare prin analiza influenței alcoolului asupra precursorilor neurotransmițătorilor. Deocamdată, în cazul serotoninei și al acetilcolinei nu a fost stabilită o dependență de eventuala alterare a precursorilor. Dimpotrivă, pentru dopamină se întrevede această relație, sugerată de faptul că etanolul poate influența sistemul de transport al metaboliților aminelor. Prin măsurarea acestor metaboliți a fost posibilă constatarea unei creșteri a dopaminei în corpul striat (114).

În realitate, datele asupra neurotransmițătorilor în alcoolism sînt mult mai numeroase, dar din cauza rezultatelor extrem de contradictorii am evitat să le prezentăm.

Pornind de la alterările posibile ale neuromediatorilor, este oportun să amintim „teoria multimetaboliților" conturată după 1970 (76). Punctul de pornire al teoriei a fost descoperirea faptului că formaldehida poate condensa cu dopamina, prin intermediul reactivului Schiff, alcătuit din derivați de izochinolină. Aceeași reacție a fost constatată între acetaldehidă și dopamină, rezultînd o metiltetrahidroizochinolină, simplă, denumită salsolinol. De asemenea, acetaldehida poate condensa cu norepinefrina formînd o tetrahidroizochinolină. Se știe că metabolizarea alcoolului în organism poate fi divizată în trei etape de bază: 1) transformarea etanolului în acetaldehidă; 2) conversia acetaldehidei în acetat; 3) oxidarea acetatului în CO_2 și apă. După cum se observă, acetaldehida ocupă un loc central în mecanismele de detoxifiere hepatică. În elaborarea teoriei multimetaboliților a fost decisivă constatarea că produșii de condensare ai acetaldehidei pot acționa ca *„falși transmițători"*. Ei pot fi stocați în veziculele conținînd neurotransmițători și ca urmare pot juca un rol de falși transmițători, cu efecte importante asupra sintezei și metabolismului neurotransmițătorilor, ca și asupra enzimelor de metabolizare și catabolism ale acestora. Cauza reacțiilor de condensare poate fi inhibiția competitivă prin acetaldehidă a aldehidelor biogene din sistemele de catabolism ale enzimelor. Dopamina este oxidată în creier exclusiv pe calea oxidativă; în acest caz blocarea aldehiddehidrogenazei devine posibilă. Sinteza și prezența produșilor de condensare în creier nu a fost demonstrată (19, 20, 22, 23).

O probă în favoarea teoriei amintite o constituie, totuși, prezența salsolinolului, la concentrații semnificative, în urină și L.C.R la etilicii cronici. Rezultate recente probează prezența substanței și la nonalcoolici, dar în cantități foarte reduse, ceea ce ar putea constitui un argument în favoarea unei funcții fiziologice a alcaloidului (96). Alți cercetători menționează posibili-

Scanned with OKEN Scanner

tatea că reacțiile de condensare au loc și pe substraturi diferite de acetaldehidă, ca alfa-acetoacizii (42).

Prin ipoteza multimetaboliților se avansează în modificările biochimice complexe din alcoolism, care conțin multe necunoscute. Chiar dacă pînă la urmă se va obține un tablou convingător al „neurotransmițătorilor falși", acțiunea acestora trebuie corelată în ultimă instanță cu modificările biomembranelor. Deocamdată, nici alterările metabolice produse de etanol la nivelul lipidelor din membrană nu sînt cunoscute decît parțial.

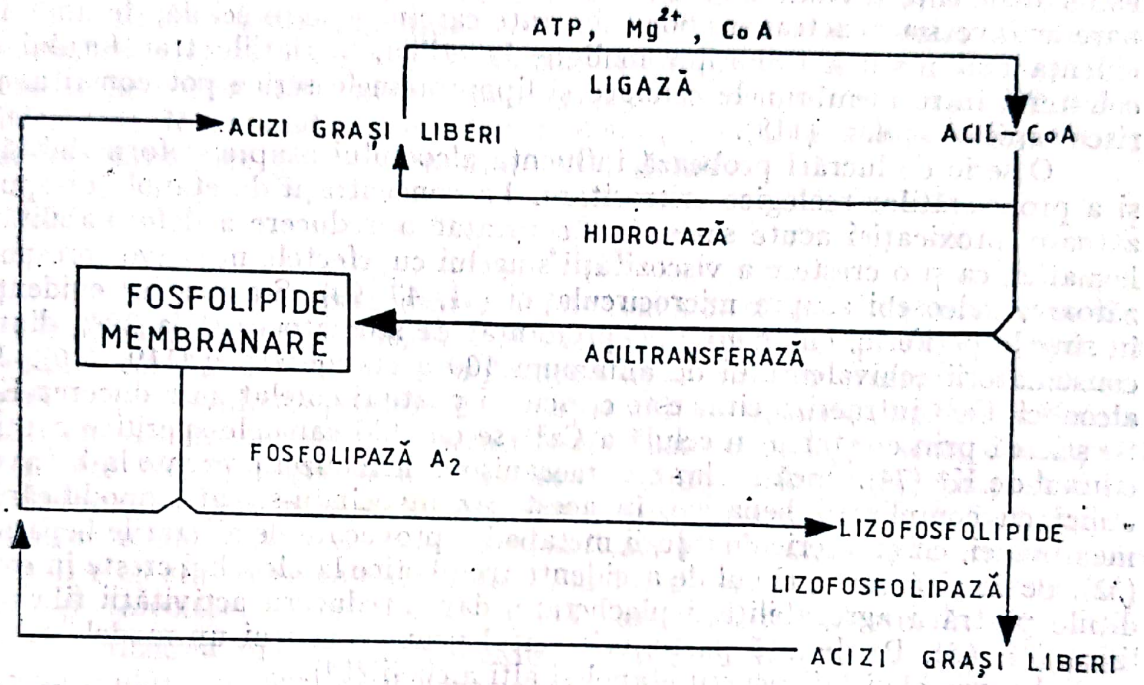


Fig. X. 2 — Schemă reprezentînd relațiile dintre metaboliții fosfolipidelor. Este evident că etanolul poate afecta *turnover*-ul fosfolipidelor din membrană prin alterarea activităților aciltransferazei și fosfolipazei A_2 (După G. Y. Sun și A. Y. Sun, 1985) (106).

Există totuși un fenomen evident: afectarea de către etanol a *turnover*-ului (în sensul de reînnoire, schimb) fosfolipidelor membranare prin alterarea activităților aciltransferazei și fosfolipazei A_2 (fig. 2). Astfel, P.T. Nhamburo și colab. au obținut date preliminare indicînd inhibarea *in vitro* de către alcool a activității fosfolipazei A_2 stimulată de Ca^{2+}, în sinaptozomii de șobolan. Creșterea activității enzimei la animalele cu toleranță la alcool este interpretată drept un mecanism de rezistență la efectul inhibitor al etanolului. S-au efectuat, de asemenea, cercetări asupra funcțiilor aciltransferazelor în sinaptozomii din creier, datele probînd, în general, o creștere. Utilizîndu-se acizi grași marcați cu ^{14}C s-a constatat o creștere a ratei de încorporare a acestora, ca și a ^{32}P anorganic (1, 7, 78).

Diacilglicerolul s-a dovedit un bun indicator al metabolismului unui fosfolipid membranar, fosfatidilinozitolul. În intoxicația acută, diacilglicerolul scade, ceea ce implică și o reducere a fosfatidilinozitolului. Cunoașterea variațiilor diferitelor tipuri de fosfolipide este importantă în explicarea perturbării funcției unor receptori în alcoolism, dar deocamdată datele nu sînt edificatoare.

4. ALTE EFECTE MOLECULARE ALE ALCOOLULUI ETILIC

Din ampla literatură dedicată descifrării bazelor moleculare ale acțiunii etanolului vom mai selecta cîteva aspecte.

Una din implicațiile fixării moleculelor de alcool la nivelul biomembranelor o constituie alterarea difuziunii membranare a unor substanțe lipofile. Astfel, absorbția vitaminelor liposolubile poate să se reducă, explicîndu-se astfel deficiențele vitaminice din alcoolism. Dimpotrivă, alterările membranare ar favoriza penetrarea unor substanțe carcinogene în celulă, de unde incidența mai mare a tumorilor maligne la etilici. Variațiile transferului de colesterol între membranele celulare și lipoproteinele serice pot constitui un risc cardiovascular (118).

O serie de lucrări probează influența alcoolului asupra deformabilității și a proprietăților reologice eritrocitare. La concentrații de etanol corespunzătoare intoxicației acute severe s-a constatat o reducere a deformabilității hematiei, ca și o creștere a viscozității sîngelui cu efectele negative corespunzătoare, îndeosebi asupra microcirculației (41, 47, 99). S-a pus în evidență, în sîngele periferic, chiar un grad pronunțat de stomatocitoză la 29% dintre consumatorii echivalentului de minimum 100 g etanol zilnic (119, 120). La alcoolici, Ca^{2+} intraeritrocitar este crescut și poate fi corelat cu reducerea K^+. Se știe că prin creșterea în celulă a Ca^{2+} se deschid canalele specifice pentru efluxul de K^+ (74). Încă neclar este mecanismul hemolizei prezente la bolnavii etilici cu complicații hepatice, în acest caz invocîndu-se atît modificările membranei, cît și o serie de injurii metabolice provocate de alterările hepatice (32). Pe de altă parte, riscul de accidente trombotice la alcoolici crește în condițiile păstrării agregabilității plachetare, dar a reducerii activității fibrinolitice (41, 65). Pe de altă parte, eritrocitul poate constitui un model util în studiul permeabilității pentru etanol și alți alcooli (14).

Utilizarea frecventă, în ultima vreme, a litiului în terapia unor psihoze a crescut numărul cercetărilor referitoare la acest element. Recent s-a constatat că administrarea litiului la șobolanii Wistar (1,5 miliechivalenți pe kgcorp) concomitent cu alcoolul (2 g/kg) a accelerat dezvoltarea toleranței la alcool, în comparație cu un lot martor care a primit aceeași cantitate de alcool, dar în loc de litiu o soluție salină. Mecanismul acțiunii litiului în acest caz rămîne, încă, neexplicat, invocîndu-se antagonismul său cu procesele de depleție a guanozin-3',5'-monofosfatului ciclic și de stimulare a eliberării de dopamină la nivelul creierului provocate de etanol. Printr-o altă ipoteză se consideră efectul litiului nespecific, consecință a polidipsiei și poliuriei, acompaniată și de eliminarea alcoolului (12, 13, 75). Sînt intens studiate modificările imunologice din cadrul alcoolismului. Referindu-ne la cercetările care vizează membrana, doar concentrațiile forte de etanol, net superioare celor întîlnite în clinică, alterează *in vitro* proprietățile polinuclearelor neutrofile. La consumatorii ocazionali de alcool și la etilici, fagocitoza este unica funcție perturbată fără consecințe asupra efectului bactericid. Dimpotrivă, la alcoolici cirotici chemotactismul, fagocitoza și capacitatea bactericidă sînt net deprimate. Se afirmă că acțiunea directă a alcoolului asupra polinuclearelor nu pare responsabilă de fragilitatea alcoolicului cronic la infecțiile bacteriene (114). În realitate efectele primare de la nivelul stratului dublu lipidic pot acționa indirect, inclusiv prin alterarea granulocitopoiezei.

Scanned with OKEN Scanner

Raporturile alcool, imunitate, cancer sînt încă și mai obscure. Mai mult pe plan teoretic se afirmă că imunodepresia indusă de alcool, ca și carențele îndeosebi carența în zinc, ar favoriza cancerogeneza. Concentrarea investigațiilor la nivel molecular, începînd cu lanțul acțiunilor primare ale alcoolului, este singura cale în clarificarea acestor raporturi.

Un aspect, cu caracter aparent doar teoretic, îl reprezintă modul în care trebuie exprimate efectele moleculelor amfipatice, etanolul avînd acest caracter. În mod tradițional, aceste efecte se exprimă prin concentrația la nivelul membranei, dependentă de coeficientul de partaj între cele două faze, lipidică membranară și apa din preajma celulei. În lucrări recente, pornind de la o tratare termodinamică a fenomenului se demonstrează necesitatea exprimării efectului fiziologic al acestor substanțe în termeni care să exprime dezordinile provocate la nivelul membranei, ca o reflectare a variațiilor fluidității (11). Recomandarea este logică, deoarece (numai astfel) efectele moleculelor amfipatice pot fi comparate fără dubii.

* * *

La finele acestei prezentări se poate conchide că acțiunea alcoolului asupra biomembranelor conține, încă, multe necunoscute. Se presupune chiar că efectele etanolului sînt mai subtile decît apar pînă în prezent, în afară de lipofilie, fiind evidentă posibilitatea unor reacții covalente cu lipidele membranare, cu formare de esteri. Cercetările efectuate pînă în prezent, conturează premisele unei înțelegeri la nivel molecular a modificărilor de comportament și a proceselor fiziologice de la nivelul sistemului nervos central. Perturbările lipidelor membranare, o serie de modificări biochimice caracteristice și în primul rînd stabilirea rolului acetaldehidei, influența factorilor genetici, precum și dezvoltarea toleranței la etanol sînt conturate destul de clar.

Realizarea unei explicații globale, utilă în profilaxia și tratamentul alcoolismului, necesită completarea rezultatelor existente cu noi probe experimentale.

Bibliografia selectivă

1. ABOOD L. G., BUTLER M., REYNOLDS D. — Molec. Pharmacol., 1980, 17, 290.
2. ALLING C., BOSTROM K. — Acta Neuropathol., 1980, 50, 77.
3. ALLING C., DENCKER S. J., SVENNERHOLM L., TICHY J. — Acta Med. Scand., 1969, 185, 99.
4. ALLING C., GUSTAVSSON L., KRISTENSSON A., WALLERSTEDT S.—Scand. J. Clin. Lab. Investig., 1984, 44, 283.
5. ALLING C., LILJEQUIST S., ENGEL J. — Med. Biol., 1982, 60, 149.
6. ARAI M., GORDON E. R., LIEBER C. S. — Biochim. Biophys. Acta, 1984, 797, 320.
7. BARAONA E., LIEBER C. S., — J. Lipid Res., 1979, 20, 289.
8. BARBACCIA M. L., REGGIANO A., SPANO P. F., TRABUCCHI M. — *Drug Alcohol Depend.*, 1980, 6, 188.
9. BEASLEY J. D. — Biomed. Pharmacother., 1986, 40, 43.
10. BEAUGE F., STIBLER H., KALANT H. — Pharmacol. Biochem. Behav., 1983, 18, 519.
11. BOIGEGRAIN R. A., FERNANDEZ Y., MASSOL M., MITJAVILA S. — Chem. Phys. Lip., 1984, 35, 321.

Scanned with OKEN Scanner

53. HOFFMAN P. L., URWYLER S., TABAKOFF B. — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1982, 222, 182.
54. HOSEIN E. A., LEE H., HOFMANN I. — Canad. J. Biochem., 1980, 58, 1147.
55. HUNT W. A. — Neurosc. Biobehav. Rev., 1983, 7, 87.
56. HUNT W. A., MAJCHROWICZ E. — in *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*, vol. 2, (sub red. *E. Majchrowicz, P. E. Noble)*, Plenum Press, New York, 1979, pp. 167—205.
57. ISRAEL Y., KURIYAMA K. — Life Sci., 1971, 30, 591.
58. JOHNSON D. A., FREIDMAN H. J., COOKE R., LEE N. M. — Biochem. Pharmacol., 1980, 29, 1673.
59. JOHNSON D. A., LEE N. M., COOKE R., LOH H. H. — Molec. Pharmacol., 1979, 15, 379.
60. KAMADA T., SETOYAMA S., CHUMAN Y., OTSUJI S. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1983, 116, 547.
61. KNOX W. H., PERRIN R. G., SEN A. K. — J. Neurochem., 1972, 19, 2881.
62. KREISHMAN G. P., GRAHAM-BRITTAIN G., HITZEMANN R. J. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 130, 301.
63. KREISHMAN G. P., GRAHAM-BRITTAIN C., SCHNELER H., HITZEMANN R. J. — Alcohol Drug Res., 1986, 6, 1.
64. LEE H., HOSEIN E. A. — Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1986, 64, 85.
65. LEE K., NIELSEN J. D., ZEEBERG 1., GORMSEN J. — Acta Neurol. Scandinav., 1980, 62, 287.
66. LEVENTAL M., TABAKOFF B. — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1980, 212, 316.
67. LIEBER C. S., JONES D. P., MENDELSON J., DE CARLI L. M. — Trans. Assoc. Am, Physicians, 1963, 76, 289.
68. LILJEQUIST S. — Acta Pharmacol. Toxicol., 1978, 43, 19.
69. LILJEQUIST S., CARLSSON A. — J. Pharm. Pharmacol., 1978, 30, 728.
70. LITTLETON J. M., JOHN G. — J. Pharm. Pharmacol., 1977, 29, 579.
71. LITTLETON J. M., JOHN G. R., GRIEVES S. J. — Alcoholism: Clin. Exp. Res., 1979, 3, 50.
72. MASSAROTI M. — Pharmacol. Biochem. Behav., 1983, 18, 51.
73. MC MURCHIE E. J., ABEYWARDENA M. Y., CHARNOCK J. S., GIBSON R. A, — Biochim. Biophys. Acta, 1983, 734, 114.
74. MELTZER H. L., ALEXOPOULOS G. — J. Clin. Pharmac., 1982, 22, 466.
75. MESSIHA F. S., FROST E. E., SPROAT H. F. — Drug Chem., Toxic., 1983, 6, 397.
76. MYERS R. D. — in *Aldehide Adducts in Alcoholism* (sub red. *M. A. Collins)*, Alan R. Liss, New York, 1985, pp. 201—220.
77. NERVI A. M., PELUFFO P. O., BRENNER R. R., LEIKIN A. I. — Lipids, 1980,. 15, 263.
78. NHAMBURO P. T., JOHN G. R., LITTLETON J. M. — Alcoh. Clin. Experim. Res., 1984, 8, 110.
79. PERLMAN B. J., GOLDSTEIN D. B. — Mol. Pharmacol., 1984, 26, 547.
80. POON R., CLARK W. R. — Biochem. Biophys. Acta, 1982, 689, 230.
81. RASKIN N. H. — New Engl. J. Med., 1975, 292, 422.
82. RICHARDS C. D., MARTIN K., GREGORY S., KEIGHTLEY C. A., HESKETH T. R., SMITH G. A., WARREN G. B., METCALFE J. C. — Nature, 1978, 276, 775.
83. ROBBLEE N. M., CLANDININ M. T. — J. Nutr., 1984, 114, 263.
84. ROSS D. H. — Alcoholism: Clin. Exp. Res., 1978, 2, 139.
85. ROSS D. H., GARRET K. M., CARDENAS H. L. — Drug Alcohol Depend., 1979, 4, 183.
86. ROSS D.H., GARRET K. M., Javors M., Gragy N., CARDENAS H. — Drug Alcohol Depend., 1980, 6, 59.
87. ROSS D. H., KIBLER B. C., CARDENAS H. L. — Drug Alcohol Depend., 1977, 2, 305.
88. ROSS D. H., MEDINA M. A., CARDENAS H. L. — Science, 1974, 186, 63.
89. ROTTENBERG H., WARING A., RUBIN E. — Science, 1981, 213, 583.
90. ROVINSKI B., HOSEIN E. A. — Biochim. Biopyhs. Acta, 1983, 735, 407.
91. ROWE E. S. — Biochim. Biophys. Acta, 1985, 813, 321.
92. RUBIN E., LIEBER C. S. — New. Engl. J. Med., 1974, 298, 128
93. RUBIN E., ROTTENBERG H. — Pharmac. Biochem. Behav., 1983, 18, 7.
94. SHANBOUR L. L. — Alcoh. Clin. Exper. Res., 1979, 3, 142.

Scanned with OKEN Scanner

XI. Alterări structurale și funcționale ale suprafeței celulare în cancer

„Clinica umană și veterinară, biologia generală, biochimia, biofizica, biologia moleculară, imunobiologia, genetica, endocrinologia, virusologia și multe alte discipline colaborează strîns la lămurirea enigmei cancerului, Clinicianul nu mai poate face față acestei boli, fără să-i cunoască bine aspectele biologice fundamentale".

I. CHIRICUȚĂ (1984)

În ultimii ani au fost descrise numeroase modificări ale biomembranelor, sau ale suprafeței celulare în ansamblul său, la celulele tumorale în comparație cu celulele normale omologe. Alterările constatate sînt de o diversitate extremă și afectează diferitele categorii moleculare componente ale membranelor, dinamica lor în membrană și funcțiile care sînt în relație cu aceste molecule. Ca urmare se modifică, în ultimă instanță pînă la alterare, enzimele antigenele, receptorii celulari specifici hormonilor sau altor molecule purtătoare de informație, procesele de transport prin membrană și de biogeneză ale acestor structuri. De asemenea, apar modificări la nivelul citoscheletului și în procesele de contact intercelular (fig. 1). În fața unei astfel de diversități, problema esențială care trebuie clarificată constă în a stabili în ce măsură toate aceste variații concură la tumorigenicitate, adică la potențialul anumitor celule de a avea un comportament neoplazic *in vivo;* principalii indicatori de malignitate fiind creșterea infiltrativă, cu consecințele sale, invazia și metastazele. Din acest punct de vedere, este dificil să se precizeze dacă biomembranele mediază direct transformarea tumorală a unei populații de celule.

În ultimul timp a fost susținută tot mai clar, cu puternice probe de ordin experimental, ideea că la nivelul genomului celular se află cheia determinismului carcinogenezei. Acceptînd această tendință, alterările suprafeței celulare pot fi considerate asociate, sau derivate prin mecanisme de tip *feedback* în raport cu evenimentele cauzale inițiale. Cu alte cuvinte, multiplele alterări moleculare ale suprafeței celulare ar fi expresia fenotipică a genotipului modificat. În realitate, există mai multe argumente care conduc la concluzia că modificările membranei celulare la celulele transformate trebuie acceptate doar parțial drept o expresie a reprogramării genetice. Astfel, unele caracteristici dezvoltate sînt tipice membranei celulelor embrionare, sau ale altor celule din organismul adult care au dobîndit o linie diferită în dezvoltarea ontogenetică. În adiție, modificări ale compoziției membranei în faze distincte ale ciclului celular, dacă sînt ireversibile, pot contribui la dezvoltarea malignă (24). Aceasta, deoarece membrana celulară joacă un rol important

Scanned with OKEN Scanner

în diviziunea și diferențierea celulară prin conexiunile intime cu citoscheletul (a se vedea cap. VI). La argumentele enumerate s-au adăugat recent și altele, astfel încît rolul „subaltern" al membranei în carcinogeneză se cere reexaminat.

1. ROLUL BIOMEMBRANELOR ÎN CANCEROGENEZĂ

În prezent este larg acceptat faptul că în inducerea cancerului, atît la animale de experiență cît și la om, sînt implicați nu numai factorii genetici, ci și cei epigenetici. Aceasta sugerează că tumorile maligne pot rezulta din interacțiunea continuă a celulelor țintă cu factorii fiziologici și de mediu. Fiecare factor poate juca un rol crucial în procesele de cancerogeneză (69). Implicarea factorilor genetici și epigenetici a condus la divizarea procesului de carcinogeneză în două faze, pe baza unor date experimentale precise.

Ideea divizării în două etape a apărut, pentru prima oară, în studiul cancerogenezei la nivelul pielii de șoarece (16). Astfel, substanțe chimice, ca metilcolantrenul, agent mutagen uzual, induc tumori sau cancer la nivelul pielii, după aplicări repetate. Dimpotrivă, o singură aplicare a unei doze mici nu va induce nici o tumoră. Totodată, dacă o altă substanță, reprezentată de 12-0-tetra-decanoilforbol-13-acetat (TPA) este aplicată după tratamentul unic cu agentul mutagen chimic, tumorile vor fi induse frecvent. Acțiunea TPA este efectivă după cîteva luni de la aplicarea agentului mutagen chimic. Aplicarea TPA singur nu are efect cancerigen. Aceste fapte experimentale conduc la două idei foarte importante: 1) deoarece aplicarea mutagenelor chimice este o condiție a inducției tumorale de către TPA, iar efectul acestor substanțe chimice este conservat mult timp, chimicalele produc o modificare genetică (prezumptiv mutația unei gene) în celulele țintă; 2) dat fiind că TPA induce tumori numai în țesuturi tratate în prealabil cu mutagene chimice și efectul este reversibil odată cu încetarea aplicării sale, interacțiunea TPA cu celulele țintă nu este genetică, ci epigenetică. Aceste procese, genetic și epigenetic au fost denumite inițiere și, respectiv, promoție. Cele două etape ale carcinogenezei au fost demonstrate de asemenea, la nivelul ficatului și vezicii urinare de șobolan (69).

1.1. Factori de inițiere și de promoție în carcinogeneză

Carcinogeneza se produce deci, în esență, în două etape: a) de inițiere; b) de dezvoltare sau de promoție. Faza de inițiere este determinată fie prin încorporarea în genomul celular a unei informații genetice de „tip tumoral" (virusuri oncogene sau oncogene naturale, reactivate din organismul respectiv), fie prin interacțiunea inițiatorilor (substanțe chimice cancerigene, radiații). Modificările genetice ireversibile apărute drept urmare a acțiunii inițiatorilor constituie starea premalignă. Prin intervenția promotorilor sau promovatorilor, care nu sînt carcinogeni sau mutageni prin ei înșiși, se vor dezvolta tumorile. Diferența majoră între inițiatori și promotori constă în faptul că primii se leagă covalent la ADN celular, unde vor produce alterări ireversibile ale genomului. După cum se va vedea, biomembranele și suprafața celulară

Scanned with OKEN Scanner

în ansamblul său reprezintă una din „țintele" fundamentale ale acțiunii promotorilor.

Progresele excepționale realizate în prezent, îndeosebi în ultimii 5 ani, în biologia moleculară a cancerogenezei vizează de predilecție faza de inițiere, etapa secundă, de promoție fiind mult mai puțin cunoscută. Vom prezenta pe scurt rezultatele extraordinare obținute în precizarea bazelor moleculare ale etapei de inițiere a procesului malign. Cel mai important eveniment a constat în izolarea și identificarea (îndeosebi cu mijloacele ingineriei genetice) în virusurile oncogene cu ARN (retrovirusuri) a *genelor onc*, sau *oncogene*, care reprezintă inițiatorul procesului de transformare malignă exercitat de infecția virală. Au fost izolate 18 oncogene conținute în retrovirusuri, denumite printr-un cod de 3 litere a căror consonanță amintește numele tumorei de origine. De exemplu, pentru prima genă caracterizată în 1978, responsabilă de sarcomul aviar Rous s-a adoptat abrevierea *src*. Se pare că repertoriul oncogenelor virale este cunoscut aproape în totalitate. Cea mai mare surpriză a fost, însă, identificarea în organismul uman sănătos a unor gene celulare normale asemănătoare cu oncogenele retrovirusurilor. Acești omologi normali ai oncogenelor virale sînt notați convențional cu *c-onc*, spre deosebire de gena virală echivalentă, notată cu *v-onc*. De pildă, *c-mos* reprezintă omologul celular normal al genei virale v-mos, oncogenă a virusului sarcomului Moleney, avînd gazdă șoarecele. Pînă în prezent au fost descoperite în celulele normale din organism oncogenele corespondente pentru 16 din cele 18 gene v-onc. Un alt moment decisiv a fost anul 1979, cînd s-a constatat că ADN izolat din celulele unui cancer indus chimic la șoarece provoacă o transformare malignă la fibroblaste cultivate *in vitro*, în prealabil izolate, tot de la șoarece (120). Acest experiment, urmat de altele care l-au confirmat este excepțional de important pentru că demonstrează posibilitatea inițierii procesului malign de însăși oncogenele din organism. Apoi, faptul că procesul se produce în absența virusurilor ar putea explica și alte căi în cancerogeneză, înafara celei virale. Acest ultim aspect este esențial, deoarece la om marea majoritate a cancerelor nu sînt de natură virală. Ca urmare, au fost descrise recent mecanismele prin care se produce activarea oncogenelor celulare, după expresia lui J. M. Bishop „inamicii din interiorul celulei" (120). De fapt, ideea existenței unor astfel de alternative ale malignizării este veche, dar abia în prezent, ipotezele s-au concretizat experimental (25, 94, 103). Primește astfel confirmare teoria oncogenă prin care se postula existența în celule a unor gene normale capabile, în anumite condiții să elibereze în citoplasmă „particule cancerigene de tip viral" (61).

TABEL 1

Factori de carcinogeneză (După E. N. Wardle, 1985) (147).

Factori de inițiere	Factori de promoție
Mutageni (de ex. fumat). Virusuri ca inițiatori. Defect de multiplicare a tulpinilor de celule.	Esteri de forbol, fenoli etc. Expansiunea clonală a celulelor inițiale. Șalone (factori de creștere) inhibate.

Etapa secundă a cancerogenezei, de promoție sau dezvoltare, este mai diversă ca alternative și poate tocmai de aceea mai puțin cunoscută, rămînînd

Scanned with OKEN Scanner

aproape un mister (12). Efectul promotorilor a fost sistematizat astfel: a) acțiuni promotoare operînd la nivelul reglării genelor; b) acțiuni promotoare la nivelul membranei celulare; c) modificări citoplasmatice implicate în acțiunile promotorilor (11, 12).

În ceea ce privește promoția cancerogenezei la nivelul reglării genelor, ea se poate declanșa în următoarele alternative: prin influența ratei mutațiilor (74), prin afectarea mecanismelor reparatorii de la acest nivel (51) și prin cauze ce produc derepresia unor gene care, în mod normal silențioase, se „retrezesc" în celulele canceroase (13). Acestor alternative li se adaugă modificări ale sensibilității celulare la acțiunea carcinogenică, dereglări ale homeostaziei hormonale și imunitare, precum și alte cauze mai mult sau mai puțin ipotetice.

Cheia progresului în studiul promoției la nivelul membranei plasmatice a constituit-o izolarea din uleiul de croton (utilizat altădată ca purgativ drastic!) a esterilor de forbol (phorbol) cu acțiune promotoare certă la nivelul membranei celulare. Cel mai activ este TPA (menționat anterior), cunoscut și sub numele de PMA (forbolmiristatacetat) . Au fost demonstrate experimental interacțiuni specifice pe biomembrane izolate *in vitro* sau pe populații celulare intacte atît pentru esterii de forbol cît și pentru alți promotori descoperiți recent, ca teleodicina și aplisiatoxina (40).

1.2. Acțiunea forbolesterilor asupra membranei celulare

Esterii de forbol se leagă pe receptorii specifici de la nivelul biomembranei (41) consecutiv producîndu-se modificări ale fluxurilor ionice (Na^+, Rb^+, Ca^{2+}), ale fosfolipidelor din stratul bilipidic, inducerea unor enzime specifice, inhibarea diferențierii celulare, ca și a comunicării intercelulare (89, 156). Ultima perturbare s-a dovedit extrem de importantă în conturarea unei explicații a efectului promotor exercitat de forbolesteri.

Efectele esterilor de forbol asupra comunicării intercelulare au readus în actualitate rolul acesteia în cancerogeneză. Se știe că la nivelul celulelor adiacente comunicarea se produce prin intermediul joncțiunilor permeabile (a se vedea cap. V).

Investigarea comunicării celulare la celulele canceroase (hepatom, tumori tiroidiene, carcinom gastric), a condus la constatarea absenței acesteia (80). În tumorile maligne predomină, deci, celulele incompetente din punct de vedere al comunicării. Uneori scăderea comunicării intercelulare a fost corelată cu caracteristicile metastazante (65). De aceea, prin utilizarea esterilor de forbol o serie de cercetători reiau problema modulării comunicării intercelulare, trecînd-o pe primul plan în explicarea efectului promotor al acestor substanțe. S-a observat, mai întîi, că forbolesterii inhibă comunicarea între celule, la nivelul unor culturi de celule variate, inclusiv de proveniență umană (49, 87, 89). Acțiunea forbolesterilor este de obicei reversibilă, atît *in vivo* cît și *in vitro*. Producerea efectelor la concentrații mici (10^{-8}—10^{-7} M), similare cu ale hormonilor, a condus la ideea existenței unor receptori pentru forbolesteri, fapt confirmat ulterior la nivelul unor variate țesuturi și celule. În acest caz, ca și în altele similare vizînd orice substanță chimică (inclusiv medicamente), este foarte probabil ca legarea să se producă pe receptori (naturali) existenți la nivelul celulei, specifici unor molecule fiziologice. Aceasta, deoarece este foarte greu de acceptat (și de demonstrat) că la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

membranei celulare există alți receptori decît cei destinați interacțiunii cu molecule endogene. Deocamdată, receptorul prezumptiv este chinaza Ca^{2+}/fosfolipid-dependentă.

Cercetările au avansat, o dată cu punerea în evidență (1985) a rolului blocării celulare în stadiul tîrziu (de promoție) al carcinogenezei *in vitro*. Astfel, pe sistemul de celule transformate Balb/c 3T3 s-a observat că efectul forbolesterilor asupra comunicării celulare este dependent semnificativ de faza de creștere a celulelor țintă. Cînd celulele se află în faza de creștere, inhibarea transferului coloranților între celule este completă, dar tranzitorie. Dacă însă, celulele tratate cu TPA sînt cultivate împreună cu TPA după confluență, în această fază creșterea lor este stopată, iar capacitatea de transfer a colorantului este inhibată continuu, pentru cîteva săptămîni (45). S-a demonstrat astfel o corelație semnificativă între inhibarea continuă a comunicării celulare și creșterea celulelor transformate malign. Ca urmare a acestor rezultate s-a concluzionat că blocarea comunicării celulelor în confluență, (adică, oprirea creșterii prin contactul celulă-celulă, inhibiția de contact clasică) mai mult decît inhibarea tranzitorie în timpul fazei de creștere, poate juca un rol important în promoția carcinogenezei *in vitro*.

O experiență de interes a fost efectuată de T. Kakunaga și J. D. Crow, pe două variante de linii celulare, dintre care una sensibilă la transformarea malignă (prin ultraviolete și benzpiren) notată Balb/c 3T3 A31—1—13, iar alta rezistentă, notată Balb/c 3T3 A31—1—8. Sensibilitatea celulelor 1—13 la transformarea indusă de carcinogene este de 100 de ori mai mare decît a celulelor 1—8 (68). Ulterior, s-a ajuns la o concluzie foarte interesantă: cele două variante de linii celulare aveau aceeași sensibilitate la mutația genetică indusă de carcinogene, sugerîndu-se astfel că diferența dintre ele nu se exprima în etapa de inițiere, ci în stadiul tîrziu (de promoție și progresiune) al transformării maligne.

Pornind de la aceste observații, într-o măsură ipotetice, H. Yamasaki și colab. au investigat dacă aceste linii celulare se deosebesc prin capacitățile lor de comunicare intercelulară, menținute în condiții similare cu cele impuse în studiul transformării maligne: cultură pe termen lung și confluență (155). Cînd celulele erau în faza de creștere, ambele variante prezentau o capacitate mare de comunicare, similară. În momentul ajungerii la confluență și deci la contact intercelular strîns, caracteristicile de comunicare ale celor două linii erau diferite: celulele 1—13 (sensibile) prezentau o comunicare redusă, în timp ce celulele 1—8 (rezistente) continuau să comunice unele cu altele, chiar în condiții de confluență. Se stabilește astfel o corelație între scăderea comunicării intercelulare și sensibilitatea la transformare malignă a liniilor celulare amintite. Observațiile efectuate susțin că diferența intrinsecă în abilitatea lor de menținere a comunicării intercelulare poate fi un determinant important al diferenței de sensibilitate a acestor variante celulare, la transformarea indusă de carcinogene (155).

Mecanismele prin care varianta celulară 1—13 și celulele tratate cu forbolesteri pierd capacitatea de comunicare intercelulară nu sînt încă suficient de clare. În cazul variantei celulare 1—13 alterarea comunicării este acompaniată de scăderea conținutului celular de AMP-ciclic (79). Un argument în plus pentru rolul posibil al cAMP, în ambele cazuri, îl reprezintă restabilirea comunicării în cazul celulelor 1—13 prin adiție de cAMP (155). Există argumente experimentale în favoarea protecției exercitate de cAMP împotriva

Scanned with OKEN Scanner

efectelor esterilor de forbol. Astfel, inducția tumorilor pielii la șoarece este suprimată prin utilizarea unor substanțe chimice care cresc conținutul celular în cAMP (45). S-a confirmat, totodată, că cAMP induce o intensificare a comunicării între celulele Balb/c 3T3. Totodată, s-a observat că cAMP protejează complet inhibarea transferului de colorant între aceleași celule, mediată de TPA (44). Acest efect protector nu a fost observat într-un mediu conținînd cafeină și butirat de sodiu, ceea ce reprezintă un argument în plus în favoarea exercitării efectului protector de către cAMP. Pe de altă parte, inhibarea sintezei *de novo* a proteinelor prin cicloheximidă și puromicină produce o suprimare a efectelor cAMP (44). Rezultă că acțiunea cAMP necesită sinteză de noi proteine, ceea ce poate duce la ipoteza efectului cAMP prin intermediul inducției unei sinteze a proteinelor ce alcătuiesc joncțiunile permeabile.

Toate experimentele menționate sugerează cu pregnanță că blocarea comunicării intercelulare poate avea un rol cauzal crucial în procesul de carcinogeneză. Datele acumulate indică în mod evident că esterul de forbol poate produce blocarea comunicării intercelulare prin intermediul legării cu receptorii membranari, constituiți probabil de chinaza Ca^{2+}/fosfolipid-dependentă. Protecția la acest efect realizată de cAMP se produce prin intensificarea comunicării celulare, probabil, prin intermediul activării chinazei cAMP-dependente. Pe lingă importanța în aprofundarea mecanismelor carcinogenezei, cele două chinaze permit, prin efectele lor, concluzia că ele ar putea reprezenta elementele cheie în reglarea fiziologică a comunicării celulare. Perturbarea sistemului de chinaze prin factori endogeni și exogeni poate fi responsabilă de faza de promoție a inducției cancerului (69). Se impune însă necesitatea unor demonstrații mai directe, îndeosebi referitoare la modul în care pot trece o serie de molecule la nivelul joncțiunilor permeabile și, legat de aceasta, mecanismele prin care reglează funcțiile populațiilor celulare. Deocamdată, în afară de cele două chinaze menționate anterior, s-a mai demonstrat modularea comunicării celulare de către moleculele de adeziune. Astfel, recent au fost izolate molecule de adeziune Ca^{2+}-dependente. Anticorpii monoclonali contra acestor molecule inhibă comunicarea între celulele teratocarcinomului (69).

Apariția cancerului în organism este un proces în care celulele au pierdut controlul armonios al creșterii. Cunoașterea mecanismelor de creștere și diferențiere celulară rămîne, însă, deocamdată, fragmentară. Controlul creșterii prin intermediul comunicării celulare poate fi unul dintre aceste mecanisme. Pentru clarificare este necesară stabilirea precisă a rolului ionilor, ca Na^+ și K^+, nucleotidelor și nucleotidelor ciclice, ca cAMP, care trec prin joncțiunile permeabile. Date mai convingătoare se referă la Na^+ și K^+, ale căror concentrații intracelulare sînt reglate de (Na^+, K^+)-ATP-ază și în unele cazuri de sistemul antiport Na^+/H^+. S-a dovedit că aceste sisteme de transport sînt activate de promotorii de tip forbolester ca și de factorii de creștere (60, 140). De asemenea, cAMP joacă un rol important nu numai în comunicare ci și în creșterea celulară (18). Este sigură, în perspectivă, obținerea de noi informații deopotrivă asupra modulării comunicării intercelulare și a mecanismelor alterării creșterii celulare, ce reprezintă o cale importantă în explicarea moleculară a cancerogenezei. Rolul membranei în acest caz este evident și depășește alternativa unei simple expresii a alterărilor fenotipului.

Scanned with OKEN Scanner

2. ALTERĂRI ALE MICROANATOMIEI SUPRAFEȚEI CELULARE

Dezvoltarea metodelor de microscopie electronică a furnizat un inventar amplu al modificărilor microanatomiei suprafeței celulare. Deși punctele de interes al cercetării sînt concentrate în prezent spre descifrarea bazelor moleculare ale cancerogenezei, metodele de microscopie electronică rămîn în actualitate din trei motive importante: a) se confirmă prin intermediul lor o serie de proprietăți „macroscopice" ale celulelor transformate malign; b) se tentează asocierea probelor de la nivel molecular cu imaginile de microscopie electronică obținute prin procedee evoluate, ca microanaliza nucleară (a se vedea cap. VI) și variantele recente ale tehnicilor de criofractură; c) în cazul implicării citoscheletului imaginile obținute prin microscopie electronică au o utilitate particulară.

Datele cele mai ample asupra alterărilor microanatomiei se referă la diferitele tipuri de joncțiuni intercelulare. Încă din 1944, D. R. Coman punea în evidență o alterare fundamentală, care depinde de suprafața celulară, scăderea adezivității celulare mutuale, pe care o considera un factor facilitant al invaziei și metastazelor (35). Ulterior, defectele adeziunii au fost confirmate prin tehnici sofisticate. În mai multe cazuri, scăderea adeziunii este atestată în microscopia electronică prin asocierea cu reducerea joncțiunilor specializate. Reducerea numărului de joncțiuni strînse, permeabile și desmozomale a fost observată în țesuturi epiteliale variate, constatîndu-se o corelație cu potențialul invaziv al tumorilor, ori cu severitatea anormalităților arhitecturii structurale. Atenuarea joncțiunilor, comună în carcinogeneză, are ca rezultat disrupția în mediul extracelular (150).

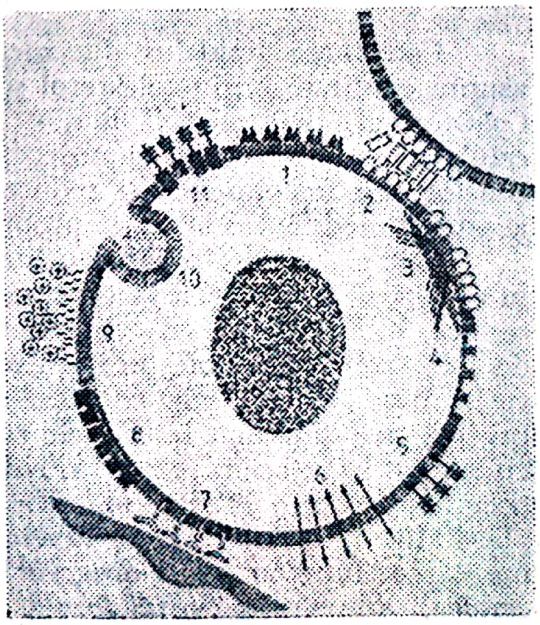


Fig. XI. 1 — Modificările multiple ale suprafeței celulare consecutive transformării maligne: 1) alterarea enzimelor; 2) creșterea aglutinabilității; 3) modificări ale citoscheletului și ale mobilității constituenților membranari. 4) pierderea de antigene specifice; 5) pierderi sau alterări ale glicolipidelor; 6) alterări ale permeabilității; 7) diminuarea adeziunii și inhibiției de contact; 8) apariția de antigene noi; 9) modificări de densitate a sarcinilor suprafeței celulare; 20) perturbarea exocitozei și a endocitozei; 11) pierdere sau alterări ale glicoproteinelor (După G. L. Nicolson, 1976, 1984) (91, 92).

Reducerea joncțiunilor permeabile conduce la izolarea celulelor maligne de influențele exercitate de către celulele vecine asupra controlului creșterii.

Deși joncțiunile intercelulare joacă un rol important în adeziunea mutuală a celulelor, contribuția fiecărui tip de joncțiune nu este stabilită clar.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel, rolul desmozomilor în celulele maligne este foarte controversat. Au fost detectate, prin microscopie electronică, toate cele trei alternative posibile: număr scăzut, crescut, sau o frecvență normală (75). În tumorile mamare joncțiunile impermeabile lipsesc în totalitate, dar desmozomii apar normali (67). Reducerea numărului de desmozomi este corelată cu gradul de malignitate în unele sisteme celulare, dar nu și în altele. Într-o serie de cazuri frecvența poate fi strîns corelată cu comportamentul invaziv ori cu gradul de diferențiere, mai mult decît cu gradul de malignitate (3). Prin alte studii de microscopie electronică s-a sugerat că nu frecvența desmozomilor poate reprezenta un criteriu valid, ci procentajul ariei suprafeței celulare ocupat de aceștia. Suprafața celulară ocupată crește în cancerul vezicii urinare indus chimic prin sporirea dimensiunii desmozomilor, datorită diferențierii scuamoase. A fost semnalată, de asemenea, invadarea cu desmozomi a celulelor, discrepanță explicată prin *turnover*-ul asincron al acestora în cadrul populației celulare tumorale (100).

Nu se poate atesta existența unor modificări tipice structurale sistematice ale contactelor intercelulare. Rezultă de aici, fapt confirmat și prin cercetarea altor caracteristici ale celulelor canceroase, că tumorile sînt compuse din populații celulare eterogene. Numai unele subpopulații sînt capabile de metastazare și, probabil, de invazie. Este sigur că celulele metastatice reprezintă variante fenotipice ale populației celulare tumorale primare. De aici interesul selecției *in vivo* sau *in vitro* a diferitelor subpopulații pentru caracterizarea lor ultrastructurală și funcțională (43).

3. MODIFICĂRI ALE LIPIDELOR ȘI ALE FLUIDITĂȚII MEMBRANEI

Cercetarea lipidelor din membrană în carcinogeneză s-a concentrat asupra conținutului în colesterol și a variațiilor structurale ale glicolipidelor. Colesterolul, determinant major al proprietăților biofizice ale membranei celulare, servește drept „amortizor de fluiditate", prin creșterea fluidității zonelor acil fosfolipidice și reducerea tranzițiilor gel/cristal lichid. În felul acesta el modifică o serie de proprietăți funcționale ale membranei.

Primele rezultate care au atestat alterări ale conținutului membranar în colesterol s-au referit la carcinomul hepatocelular murin și la celulele leucemice, în ambele cazuri celulele exprimînd o reglare aberantă a biosintezei de colesterol (125). Colesterolul exogen inhibă sinteza de colesterol în țesuturile normale, în timp ce acest control printr-un mecanism de conexiune inversă este diminuat la celulele transformate malign. În cazul celulelor carcinomului hepatocelular murin, reducerea controlului *feedback* al sintezei este acompaniată de o creștere semnificativă a colesterolului la nivelul membranei plasmatice, exprimată și la nivelul membranelor intracelulare (31). O asemenea corelație nu a fost observată însă la nivelul plasmalemei celulelor leucemice, care exprimă o scădere a conținutului în colesterol. Fenomenul s-ar explica prin alterarea ratei de schimb a colesterolului între membrana plasmatică a celulelor leucemice și lipoproteinele serice (66). Reducerea colesterolului membranar la celulele leucemice este masivă, la circa jumătate în raport cu celulele normale (124). Membranele sînt în acest caz mai fragile și ca urmare

Scanned with OKEN Scanner

se rup ușor, fapt demonstrat prin disrupția celulelor după injectarea lor intraperitoneală (43). Este clară în acest caz afectarea fluidității membranei, creșterea sa corespunzînd unei microviscozități mai reduse a membranei. Modificarea va avea drept consecință alterarea mobilității rotaționale și a deplasării verticale a proteinelor integrale din membrană (66). Excepție fac leucocitele din leucemia cu celule „păroase" („*hairy cell leukemia*"), în care colesterolul este crescut ca urmare a sporirii biosintezei sale (153), rezultînd, consecutiv, o rigidizare a membranei. Datele menționate au fost confirmate ulterior de majoritatea autorilor, iar unele dezacorduri provin din rezultatele obținute pe membrane plasmatice izolate, ca și din faptul că limfocitele normale din diferite organe pot prezenta variații ale fluidității membranei (139). Dacă limfocitele leucemice sînt izolate din sîngele total și incubate cu lipoproteinele de joasă densitate (LDL) microviscozitatea membranei va crește, ceea ce înseamnă că alterarea membranei nu modifică funcția receptorilor specifici pentru LDL. Aceasta, deoarece creșterea microviscozității reprezintă efectul încorporării de colesterol în membrană, transportat de LDL și pătruns în celulă sub forma complexelor LDL-receptor. Totodată, din serul sanguin al leucemicilor au fost izolate microvezicule membranare cu o microviscozitate mare, ca urmare a creșterii raportului colesterol/fosfolipide. Observațiile menționate sugerează că „fluidizarea" membranelor limfocitelor leucemice rezultă din două procese: defecțiuni ale circuitului lipide serice — limfocite, ca urmare a alterării lipidelor din serul sanguin și exfolierea de vezicule membranare rigide de la nivelul suprafeței celulare.

Creșterea fluidității membranelor celulelor leucemice este în relație directă cu gradul de proliferare celulară și, deci, cu malignitatea bolii (33). Constatarea a condus la importante sugestii de ordin practic. Astfel, relația dintre malignitate și reducerea conținutului în colesterol a indus ideea utilității terapeutice a creșterii conținutului în colesterol al biomembranelor (142). Deoarece receptorii pentru LDL nu sînt afectați este posibil să se afle o soluție pentru corectarea deficitului membranar de colesterol.

Modificările parametrilor de fluiditate membranară în cancer au mai fost puse în evidență și în alte cazuri. Astfel fluiditatea membranei celulare în limfomul șoarecelui, măsurată prin metode de fluorescență a lipidelor, este mai mare cu 65% decît a limfocitelor normale (123,124). Aceste diferențe s-au menținut la lipozomii obținuți din lipide extrase din celule normale și respectiv, transformate malign.

Dacă inițial noțiunea de fluiditate a membranei era considerată, dacă nu un parametru abstract, în orice caz un subiect destinat cercetării fundamentale, după stabilirea precisă a influenței fluidității lipidelor asupra funcțiilor membranei încep să se contureze clar o serie de concluzii utile atît în practica medicală cît și în explicarea cancerogenezei. Astfel, este clar că prin creșterea fluidității membranei limfocitare va fi influențată mobilitatea receptorilor suprafeței celulare și, implicit, eficiența acestora în transmiterea mesajelor specifice. De exemplu, reducerea biosintezei de colesterol, prin tratarea limfocitelor de șoarece cu 25-hidroxicolesterol, deprimă funcția lor citotoxică. Alterarea mobilității receptorilor a fost atestată și la nivelul altor tipuri celulare transformate malign. Foarte important de precizat este determinismul creșterii celulare funcție de raportul colesterol/fosfolipide din membrană (110). În hepatom, ca și la celulele 2T3 de șoarece transformate malign de

Scanned with OKEN Scanner

virusul simian 40, creşterea fluidităţii este proporţională cu scăderea colesterolului, concomitent, creşte raţia fosfolipidelor şi gradul de nesaturare al acizilor graşi din fosfolipide (146). Se încearcă să se coreleze aceste alterări cu absenţa controlului creşterii în cazul celulelor canceroase. A fost cercetată şi relaţia dintre microviscozitatea membranei şi creşterea celulară la fibroblastele normale şi transformate, constatîndu-se o microviscozitate crescută în cazul celulelor normale. Prin adăugarea, la fibroblaşti normali de ser conţinînd factor de creştere, s-a obţinut o scădere a viscozităţii membranei. Este interesantă relaţia dintre fenotipul celular şi compoziţia în lipide a membranei. În acest sens, s-a constatat prin utilizarea unor medii cu depleţie de lipide în care s-au adăugat acizi graşi nesaturaţi, inducerea, la celulele renale provenind de la puiul de hamster, a unor transformări fenotipice caracterizate prin reducerea adeziunii celulare şi a ratelor de creştere.

Celulele maligne, chiar cu origine clonală comună, tind să dobîndească o fluiditate membranară dependentă de organul în care au colonizat (111). În acest caz este evidentă susceptibilitatea mai mare a celulelor la efectele modulatorilor externi ai fluidităţii. Subtilităţile sensibilităţii nu sînt cunoscute şi se presupune o defecţiune la nivelul enzimelor implicate în homeostazia fluidităţii membranei.

Actualmente, grupul cel mai activ în cercetarea fluidităţii membranei este cel condus de M. Shinitzky. Din numeroasele lucrări publicate de acest grup rezultă o explicaţie mai clară a efectelor variaţiilor de microviscozitate a membranei, ca şi o serie de sugestii de interes practic.

În cazul creşterii tumorale există doi parametri importanţi care pot fi asociaţi cu fluiditatea lipidică a membranei: expresia antigenelor asociate tumorale (TAA) şi activitatea antitumorală a leucocitelor din organismul gazdă. Prin elaborarea unor metode de manipulare a fluidităţii membranei *in vitro* sau *in vivo*, a devenit posibilă în prezent creşterea expresiei TAA şi sporirea activităţii leucocitelor (121). Ne vom referi în continuare la această perspectivă utilă în practica medicală. Se ştie că la nivelul celulelor tumorale, apar neoantigene specifice, care pe lîngă faptul că pot fi utilizate, cel puţin virtual, ca marcheri tumorali, reprezintă o sursă pentru „vaccinurile" antitumorale. Cu toată prezenţa antigenelor, tumorile neiradiate sînt slab imunogenice, iar încercările de creştere a capacităţii imunogene prin cuplare cu antigene puternice, sau administrare de adjuvante concomitent cu produsele imunoterapeutice, nu au dat decît rezultate minore (5).

Raţiunea pentru care imunogenicitatea la celulele canceroase neiradiate este redusă rămîne neclară. Este posibilă o mascare a proiecţiei TAA, produsă prin alte proteine ale membranei, sau datorită faptului că entităţile TAA sînt separate unele de altele prin componentele complexului major de histocompatibilitate (158). De aceea, se consideră utilă manipularea microviscozităţii membranei, în sensul creşterii sale. Creşterea se poate obţine prin două alternative: 1) încorporarea de colesterol în membranele celulare; 2) presurizarea celulelor. După ambele procedee se constată o creştere a imunogenicităţii aparente a celulelor tumorale, explicată prezumptiv prin „deplasarea laterală" sau „deplasarea verticală" a antigenelor relevante, ca o consecinţă a sporirii microviscozităţii membranei (121). Se deschide astfel o nouă posibilitate în imunoterapia cancerului la om (v. fig. 2).

Scanned with OKEN Scanner

Prezentăm pe scurt, cele două căi de reducere a fluidității membranei: 1) Încorporarea colesterolului în membranele celulelor tumorale impune un tratament îndelungat. De aceea, o alternativă mai acceptabilă constă în utilizarea esterilor naturali de colesterol, de exemplu colesterolhemisuccinatul (CHS) care se intercalează relativ rapid în membrană, inducînd o creștere

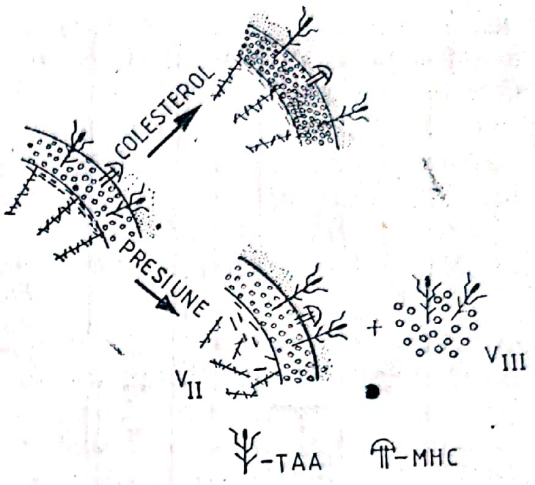


Fig. XI. 2 — Trei tipuri de „vaccin" tumoral obținute prin tratarea celulor tumorale cu presiune sau prin efectul combinat al acestora. Se reprezintă schematic efectul asupra extresiei antigenice: V_I, celule tratate cu CHS, TAA sînt mai expuși; V_{II}, celule expuse la presiune, TAA sînt mai expuși și agregați, probabil, în jurul MHC; V_{III}, desprindere de agregate alcătuite din TAA și din alte proteine ale membranei (după M. Shinitzky, 1984) (121).

acceptabilă a microviscozității lipidice. S-a demonstrat o sporire a expresiei funcționale a receptorilor membranei, antigenelor și a canalelor de transport prin încorporarea de hemisuccinat de colesterol (88). 2) În afară de utilizarea CHS se propune, în scopul manipulării fluidității, presurizarea celulelor. La 1500 atmosfere, lipidele sînt condensate pînă la un nivel dublu al microviscozității, iar rețelele microfilamentelor și microtubulilor, componente ale citoscheletului, sînt practic disociate. În aceste condiții, deoarece dublul strat lipidic este rigidizat și barierele de difuzie eliberate, cele mai multe proteine membranare se deplasează liber vertical sau lateral, iar unele chiar ies din membrană (88). O serie de proteine cu un grad de afinitate formează între ele complexe mai mult sau mai puțin stabile. După încetarea presiunii, microviscozitatea revine la nivelul său inițial, iar rețeaua citoscheletului se reface aproape integral (116). Totodată, revenirea la organizarea inițială a proteinelor în membrană este doar parțială, datorită proteinelor care au ieșit din membrană și a restricțiilor impuse de către citoschelet. Acest fapt are implicații importante în expresia TAA. A fost experimentată și combinarea celor două metode: o încorporare moderată de CHS, urmată de aplicarea presiunii (88) (fig. 2).

M. Shinitzky a prezentat recent o serie de rezultate interesante, consecutive încorporării CHS (122). În prealabil s-a remarcat o corelație mai veche între predispoziția la cancer (în particular de colon și gastric) și nivelul scăzut al colesterolului seric (fig. 3). Relația nu este explicată. În scopul modificării răspunsului imun al celulelor, ele au fost tratate *in vitro* cu CHS. S-a observat că reacția cutanată, prezentă la pacienții cu tumori solide după injecția de celule autologe (deci proprii) care în prealabil au încorporat CHS, este mult crescută în raport cu aceeași reacție cutanată produsă la celulele autologe netratate (122) (fig. 4). Se demonstrează astfel creșterea imunogenicității celulelor consecutivă micșorării fluidității membranei.

Scanned with OKEN Scanner

Declinul inevitabil al reacțiilor imune în stadiile avansate ale cancerului determină o stare de anergie. Cauza declinului nu se cunoaște, dar nu este exclusă o compoziție improprie în lipide a membranelor limfocitare, îndeosebi prin creșterea nivelului de colesterol. O situație comparabilă s-a constatat la subiecții în vîrstă, cînd creșterea raportului colesterol/fosfolipide

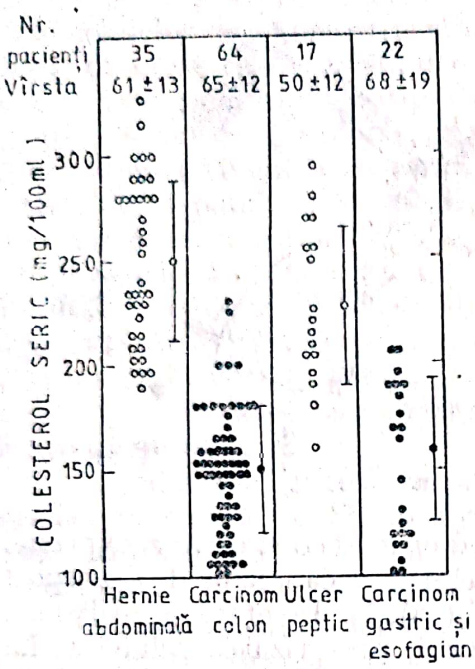


Fig. XI. 3 — Colesterolul seric la bolnavi cu cancer de colon, gastric și esofagian, comparativ cu pacienții prezentînd hernie abdominală și ulcer peptic. (După M. Shinitzky, 1986) (122).

la nivelul membranelor leucocitare este acompaniată de o supresie marcată a reactivității imune (109). Excesul leucocitar de colesterol poate fi extras cu ajutorul fosfatidilcolinei, sau cu o mixtură constînd din fosfatidilcolină, fosfatidiletanolamină și lipide neutre, toate din gălbenuș de ou (112). Mixtura lipidic-activă (*Active Lipid*) administrată inițial la animale și apoi la om, a produs o restabilire substanțială a răspunsurilor imune. Rămîne ca acest procedeu să fie testat și la bolnavii cu tumori maligne în stadii avansate. Este posibil ca aceste modalități sugerate de corectarea fluidității membranei să fie în viitorul apropiat integrate în tratamentul complex al cancerului.

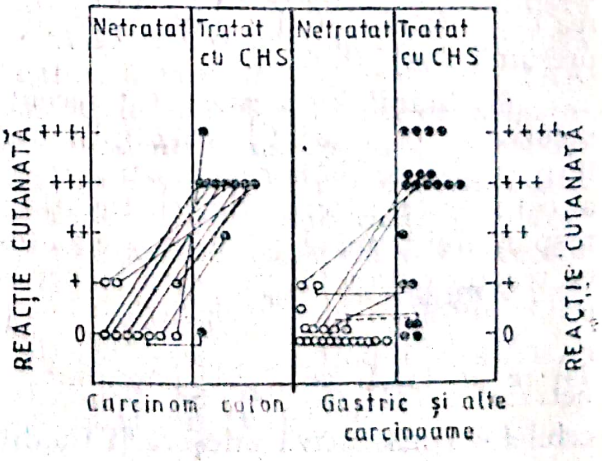


Fig. XI. 4 — Modificări ale reacției cutanate împotriva celulelor tumorale autologe după încorporarea de hemisuccinat de colesterol (CHS) la pacienții cu tumori solide. (După M. Shinitzky, 1986) (122).

4. MODIFICĂRI ALE GLICOLIPIDELOR

Transformarea malignă, *in vitro*, ca și cancerogeneza *in vivo* sînt acompaniate de alterări variate ale compoziției și structurii glicolipidelor din membrană. Glicolipidele sînt antigene și receptori ai suprafeței celulare și, ca regulă generală, celulele transformate se caracterizează printr-o simplificare a glicanilor acestor glicolipide complexe, cu acumularea de precursori mai simpli. S. Hakomori, care conduce cel mai activ grup în acest domeniu de cercetare, clasifică modificările observate în două grupe: 1) sinteză incompletă cu acumulare frecventă a precursorilor glicolipidelor; 2) activarea sintezei de noi glicolipide, chiar în absența celulelor progenitoare; în plus, glicolipidele celulelor tumorale sînt mai expuse la suprafață decît la celulele normale, datorită modificărilor de organizare ale membranelor plasmatice aparținînd celulelor canceroase (54, 55, 56).

Ambele procese, sau combinarea lor, conduc la formarea de antigene asociate tumorilor (tabel II). În prezent a devenit posibilă o analiză sistematică prin utilizarea anticorpilor policlonali, dar ansamblul complet al antigenelor glicolipidice tumorale a fost stabilit doar în cîteva sisteme tumorale experimentale. Cercetări mai complete s-au efectuat în sarcomul Balb/c și în limfomul L5178 la șoarece. În rest, informațiile obținute sînt deocamdată fragmentare.

Simplificarea complexelor glicolipidice, cu creșterea consecutivă a precursorilor simpli a fost detectată frecvent. Astfel, cantitatea de hematozid diminuă la fibroblastele transformate viral, odată cu creșterea precursorului lactozilceramidă. De asemenea, numeroase specii celulare transformate prin virusuri oncogene ARN sau ADN, sau prin cancerigene chimice, prezintă o simplificare la nivelul gangliozidelor, exprimată îndeosebi prin diminuarea

TABEL II

Tipuri de modificări ale glicolipidelor asociate cu transformarea oncogenică
(După S. Hakomori, 1985) (53)

1 — Sinteză incompletă cu sau fără acumulare de precursor, datorită blocării glicoziltransferazei.
De exemplu: blocarea sintezei GM_3, GM_1, GT, Gb_4, Gb_5 etc. și acumularea Lac Cer, Gg_3, Lc_3, GD_3, GD_2 etc.
2 — Neosinteză datorată activării *de novo* a glicoziltransferazei.
De exemplu: sinteza unor fucolipide și sialosil-fucolipide.
3 — Modificarea organizării glicolipidelor în membrană → scăderea complexității

disialogangliozidelor GD_{1a} și creșterea precursorilor: monosialilhematozid GM_3 și monosialogangliozid GM_1 (19). Această simplificare a fost depistată și la nivelul unor glicolipide neutre.

Liniile celulare de la șoarece transformate prin mai multe tipuri de virusuri atestă o reducere la nivelul gangliozidelor complexe GD_{1a}, GM_2 și GM_1. Este interesant că același tip de virus poate induce, pe diverse tipuri celulare, alterări diferite. Aceasta demonstrează că modificările glicolipidelor nu sînt specific virale, ci depind de proprietățile particulare ale celulelor gazdă.

Scanned with OKEN Scanner

Prin utilizarea mutanților virali sensibili la temperatură s-a încercat să se precizeze dacă modificările glicolipidelor sînt corelate direct cu transformarea fenotipului. Rezultatele nu sînt în întregime clare. De exemplu, cînd celule de hamster au fost transformate cu un mutant sensibil la temperatură al virusului poliomului, s-a produs o reducere a GM_3 și o creștere a GL_2 (50). Prin variația temperaturii la valori nepermise ciclului viral se așteaptă o menținere a distribuției normale glicolipidice. Totuși, s-a produs o alterare a nivelului GM_3, în timp ce GL_3, redus în cazul temperaturii permisive pentru dezvoltarea virală, a rămas neschimbat. Dimpotrivă, expresia fibronectinei la nivelul suprafeței celulare a rămas nemodificată în ambele cazuri. Rezultate similare au fost obținute prin infectarea fibroblastelor embrionului de pui de găină cu virusul sarcomului Rous normal și mutant. În acest caz, din nou doar nivelul GM_3 s-a dovedit sensibil la temperatură (56).

Există un acord asupra faptului că simplificările afectînd partea glicanică a glicolipidelor rezultă printr-o blocare a glicotransferazelor specifice. De exemplu, s-a arătat că acumularea gangliozidului GM_1 era dată de o diminuare a activității sialiltransferazei, care convertește acest monogangliozid în disialogangliozidul GD_{1a}. Totodată, această sinteză incompletă afectînd anumite glicolipide nu pare să aibă relație cu multiplicarea anarhiei ce caracterizează celula transformată. Aceasta deoarece, o serie de celule transformate care au redobîndit caracteristicile celulelor normale, prezintă în continuare simplificările de la nivelul glicolipidelor (19).

În mai multe cazuri de adenocarcinoame umane, S. Hakomori a semnalat acumularea de glicolipide bogate în fucoză, posedînd o activitate de grup sanguin Lewis (Le^a), în timp ce organismul gazdă prezenta o activitate Le^b. Această acumulare de fucolipide Le^a ar fi de asemenea legată de un blocaj al sintezei glicolipidelor cu activitate Le^b (54).

Anumite celule transformate par să reexprime antigenul Forssman, de natură glicolipidică, prezent în mod normal doar în celulele embrionare, deci un antigen carcinoembrionar. Cu toate că specia umană este considerată Forssman negativă, el a fost detectat și la om (71).

Recent (1986), grupul condus de L. Svennerholm, cel mai cunoscut din Europa în cercetarea gangliozidelor, a realizat un studiu extensiv al gangliozidelor și glicosfingolipidelor neutre la nivelul plămînului normal și în cancerul pulmonar cu celule mici (57). Plămînul de adult conține gangliozide avînd ca structură de bază lactozilceramida (G_{M3}, G_{D3} și G_{T3}), restul de circa 20% aparținînd în proporții egale seriilor ganglioteratozil și lactotetraozilceramidă. Au fost identificate 18 gangliozide cu componenta hidrocarbonată diferită, doar 4 dintre acestea fiind regăsite la celulele tumorale, observîndu-se deci aceeași simplificare menționată anterior. Plămînul uman conține 85 nmol gangliozide și 140 nmol glicosfingolipide neutre pe gram de masă celulară. Globozidul este glicolipidul neutru major. În tipul de cancer cercetat, concentrația glicosfingolipidelor neutre a fost dublă față de normal, crescînd semnificativ și concentrația gangliozidelor, care a variat între 202 și 415 nmol pe gram de țesut. În țesutul tumoral se reduce proporția de G_{D3}, dar apar 5 gangliozide asociate tumorii (57).

Relația între ansamblul general al glicolipidelor în cadrul creșterii normale a celulelor și în cel al celulelor transformate relevă cîteva similitudini.

Scanned with OKEN Scanner

În esență, glicolipidele devin mai complexe și cu densitate, mai mare, în timp ce structura globală este simplificată în ambele cazuri (37). Alterarea condițiilor de creștere a monostraturilor celulare conduce tot la un ansamblu structural simplificat (29). Aceste modificări sînt aparent induse de diferențe ale activității glicoziltransferazei.

Este evident că problema esențială constă în stabilirea semnificației modificărilor glicolipidice. După o perioadă de ambiguitate se conturează cîteva clarificări: 1) alterările glicolipidelor contribuie la reducerea adezivității celulare; de exemplu GM_3 este mai crescut la celulele transformate mai active metabolic, iar prezența sa inhibă adeziunea celulară (53); 2) modificările glicolipidelor influențează creșterea celulară, afirmație susținută de mai multe argumente experimentale: inhibiția de contact a creșterii celulare acompaniază modificările sintezei de glicolipide; o serie de glicolipide sînt mai expuse în faza G1, iar altele în faza G2; retinoizii induc inhibiția de contact, intensificînd totodată sinteza de GM_3 și răspunsul glicolipidic; anticorpii antiGM_3 inhibă creșterea celulară și stimulează sinteza de GM_3; adiția exogenă de glicolipide urmată de încorporarea în membranele celulare, inhibă creșterea celulară prin intermediul fazei G1; c) nu este clară implicarea glicolipidelor în alterarea recunoașterii celulare (53).

Un interes deosebit prezintă postularea coexistenței mai multeor locuri de legare la nivelul receptorului specific factorului epitelial de creștere (EGF), în cadrul unui model „de reglare alosterică" a receptorului. Modelul a fost inspirat de faptul că în mod evident îmbogățirea exogenă a membranei cu gangliozide inhibă creșterea celulară și mitogeneza. Deoarece organizarea gangliozidelor în membrană poate afecta configurația alosterică a receptorului, este posibil ca unul sau mai multe locuri adiționale ale receptorului hormonului de creștere să lege direct GM_1 ori GM_3, ori prin intermediul unei proteine gangliofile (118). Modelul propus poate fi utilizat în studiul reglării creșterii celulare prin intermediul gangliozidelor de la nivelul membranei. Absența sau scăderea GM_3 sau GM_1 consecutivă blocării prin diferiți agenți de transformare oncogenă poate fi cauza: a) suprimării reglării alosterice prin intermediul receptorului EGF; b) inducerii acumulării de precursori cu accentuarea consecutivă a antigenicității acestora. Modelul poate fi extins la marea varietate a factorilor de creștere, a căror expresie funcțională este asociată unor glicolipide reglatoare, adevărați „senzori" ai suprafeței celulare în raport cu mediul extern.

Una din tentativele persistente ale cercetătorilor constă în identificarea unui determinant antigenic unic în tumorile de la om. Deși această perspectivă nu se conturează, obținerea de anticorpi monoclonali antihidrocarbonați poate avea o serie de aplicații în clinică. Unele tumori eliberează antigene glicolipidice în cantitate mare în ser, iar măsurarea nivelului acestora în sînge poate servi la monitorizarea tratamentului (73). Alte antigene sînt foarte accesibile, de exemplu în sucul gastric, sau au o dispoziție tipică, față de normal (101). Este de interes și distingerea, cu anticorpi monoclonali a populațiilor celulare minore cu caracteristici tipice ale glicolipidelor din membrană. De asemenea, largi aplicații (deocamdată accesibile mai mult în cercetare) sînt posibiele în studiul modificărilor determinanților grupelor sanguine, în cadrul proceselor tumorale (47).

Scanned with OKEN Scanner

5. ALTERĂRILE DIFERITELOR PROTEINE ALE SUPRAFEȚEI CELULARE

Un număr considerabil de date atestă modificări variate ale proteinelor de la nivelul suprafeței celulare. Studiile cele mai extinse vizează în ultima vreme îndeosebi componentele matricei extracelulare.

În cazul membranei celulare în sine, punctul de interes îl reprezintă receptorii. Citoscheletul a constituit de asemenea, obiectul unor cercetări de mare profunzime, îndeosebi în cazul cancerogenezei virale. Pentru a oferi o explicație mai coerentă asupra acestui proces, alterările rețelei citoscheletice sînt prezentate într-o secțiune separată.

5.1. Modificările proteoglicanilor și glicoproteinelor matricei extracelulare

Toate componentele matricei sînt alterate, deși în amplitudini variabile cele mai multe cercetări concentrîndu-se în ultima vreme asupra fibronectinei și lamininei, datorită implicării acestora în producerea metastazelor. La acest aspect ne vom referi ulterior.

Proteoglicanii denumiți și mucopolizaharide (alcătuiți din acid hialuronic, condroitin sulfați, heparan sulfat) suferă o serie de variații asociate transformării maligne. Astfel, numeroase celule transformate viral sintetizează în exces acid hialuronic, în raport cu celulele normale, dar par a sintetiza în cantitate mai redusă proteoglican-sulfați (115). O generalizare rămîne însă delicată, fiindcă rezultatele experimentale sînt adesea foarte eterogene și, de asemenea, incomplete, deoarece provin de la un număr redus de tipuri celulare.

În cazul colagenului, mai multe lucrări atestă o diminuare în cadrul transformării maligne (46). Odată cu „disecția moleculară" a diferitelor tipuri de colagen se deschide posibilitatea unei analize mai aprofundate.

Studiul modificărilor matricei la nivelul fibroblastelor în cultură transformate, a condus la descoperirea uneia dintre cele mai importante proteine, care a devenit azi marcherul cel mai investigat. După 1973, diverse grupuri de cercetare descriu simultan, pe suprafața fibroblastelor în cultură, glicoproteine de greutate moleculară mare, foarte sensibile la proteaze și care dispăreau după transformarea malignă. Noilor molecule li s-au acordat diverse denumiri: antigenul de suprafață al fibroblastului, galactoproteina Hakomori, proteina LETD (*large external transformation sensitive protein*), denumire ce se mai utilizează și în prezent, proteina de suprafață celulară (CSP), factorul Z Robbins, factorul de atașare celulară, globulina insolubilă la frig etc. (154). Deoarece toate aceste glicoproteine posedau caracteristice comune, grupul finlandez al lui E. Ruoslahti a sugerat denumirea de *fibronectine* (în latină, *fibra* — fibră și *nectere* — a lega) (114). Fibronectinele au proprietatea de a se asocia la proteinele fibroase și în ultimii ani au fost descrise în amănunt (a se vedea cap. V).

Punctul de plecare în interesul pentru aceste proteine a fost observația diminuării cantității de fibronectină asociată suprafeței celulare, la celulele transformate prin virusuri oncogene sau prin cancerigene chimice. Totuși, există și excepții de la această regulă mai ales la celulele transformate spontan (154).

Scanned with OKEN Scanner

S-a stabilit o relație între expresia fibronectinei și capacitatea celulelor transformate de a induce tumori *in vitro* Celulele transformate capabile să producă metastaze prezintă fibronectina de suprafață redusă, în timp ce liniile celulare cu fibronectină abundentă produc tumori benigne (32). Totodată, scăderea fibronectinei în cadrul transformării maligne poate fi chiar mai mare de 5—10 ori, dar nu se poate afirma prin aceasta o sporire a tumorogenezei (149).

În culturile de fibroblaste transformate, unde celulele au tendința de creștere dezordonată, prin suprapunere unele peste altele *(criss-crossing)* adăugarea de fibronectină induce o reorganizare a celulelor între ele, dînd culturii un aspect de rețea paralelă. Adăugarea de fibronectină în culturile de fibroblaste transformate nu are totuși nici un efect asupra reglării creșterii, asupra valorilor cAMP sau asupra diminuării vitezei de transport a anumitor compuși ca hexozele sau fosfații, ori alți nutrienți (39).

Experimentele de reconstituire au sugerat rolul biologic și funcțional posibil al fibronectinei. Deoarece reducerea pînă la dispariție este asociată cu dobîndirea caracterelor de malignitate ale celulei, se pune problema dacă adăugarea fibronectinei la celulele transformate poate restaura funcțiile biologice celulare normale. Pentru a clarifica acest aspect trebuie să se stabilească dacă scăderea fibronectinei este un coprodus sau doar o manifestare secundară a transformării. S-au sugerat rolul proteinei în adeziunea celulară, susținut de faptul că diferitele fibronectine prezintă o afinitate mare pentru colagenul nativ, facilitînd, ca și fibronectinele plasmatice, adeziunea anumitor celule din culturi la substrat și etalarea lor pe substrat (154). Observația constînd în reducerea accentuată a fibronectinei la celulele componente ale tumorilor metastazante reprezintă un argument în plus. Experimente mai recente sugerează că fibronectina este, probabil, o proteină exoscheletică avînd mai curînd un rol în aspectul morfologic al celulei și nu în transformare. Există numeroase argumente în acest sens: a) celulele tratate cu fibronectină dobîndesc din nou alinierea, iar suprapunerea lor se reduce, luînd o dispoziție aproape de cea generată prin inhibiția de contact; b) crește adeziunea pe substratul celulelor; c) adăugarea anticorpilor antifibronectină reduce aceste efecte; d) celulele tratate migrează mai rapid; e) promovează reorganizarea microfilamentelor, totuși, în transformarea virală ultimul efect dispare (64). Deși fibronectina poate fi un determinant major (sau ușor de recunoscut) în menținerea morfologiei, ea nu reprezintă singurul factor.

Diminuarea sau dispariția fibronectinei de la suprafața celulelor transformate este, probabil, consecința unei reduceri a biosintezei de ARNm specific proteinei, sau a unei degradări prin proteaze, în particular prin plasmină, prezentă la suprafața celulelor transformate (1). Este posibilă și o diminuare a numărului de receptori membranari pentru această glicoproteină; nu poate fi exclusă, de asemenea, o glicozilare incompletă a proteinei în timpul biosintezei, cu o sensibilitate mare la acțiunea proteazelor (39). Totodată, absența fibronectinei nu poate fi considerată un marcher absolut al transformării maligne.

Ultima glicoproteină majoră identificată la nivelul matricei extracelulare este laminina, intens studiată în prezent (a se vedea cap. V). Deși structuramoleculară intimă a lamininei este mai puțin cunoscută decît a fibronectinei, ambele glicoproteine prezintă, cu certitudine, acțiuni de legare a celulelor cu matricea extracelulară. Există însă o deosebire de distribuție a celor două

Scanned with OKEN Scanner

proteine, importantă în clarificarea rolului distinct în țesuturile tumorale maligne. Fibronectina este larg distribuită în toate țesuturile fibroase, în plasmă (> 0,5 mg/ml) și în alte locuri, inclusiv în zona membranelor bazale. Laminina, cu o alcătuire moleculară particulară, cruciformă, este dispusă aproape exclusiv în membranele bazale, cu un nivel neglijabil (< 30 ng/ml) în circulație. Activitățile ambelor proteine sînt mediate, probabil, prin receptori distincți ai suprafeței celulare. În sînul membranei bazale, cele două glicoproteine joacă un rol capital în ancorajul celulelor epiteliale, asigurînd punți între receptorii membranari specifici prin secvențe diferite ale colagenului IV (82). Celulele intens metastatice prezintă mai mulți receptori pentru laminină decît celulele metastatice, care le conferă, probabil, o afinitate pentru membranele bazale, consecutiv o atașare mai pronunțată, fenomen decisiv, după cum se va vedea, în producerea metastazelor (78,130). Acești receptori apar distribuiți neuniform în celulele tumorale din culturi, în timp ce la celulele normale se constată o polarizare către dispunere ordonată. Nu s-a stabilit o relație între acumularea anormală a receptorilor și alte anomalii ale suprafeței celulelor transformate.

Funcția de atașare a celor două proteine a fost testată la nivelul unor tumori variate, maligne și benigne. O serie de observații, încă limitate la puține linii celulare, au indicat că în cazul celulelor cu malignitate mare se produce o atașare preferențială la laminină, în timp de celulele tumorigenice dar nemetastatice se leagă cu fibronectina (143). Aceste diferențe sînt de ordin cantitativ; deoarece laminina poate stimula atașarea la colagenul IV în ambele alternative.

Caracterizarea funcțională mai precisă a lamininei s-a conturat îndeosebi prin intermediul experimentelor de evaluare a rolului său în producerea metastazelor. Injectarea concomitentă a celulelor din melanom și a anticorpilor pentru laminină reduce incidența tumorilor pulmonare. În mod similar, coadministrarea celulelor cu fragmente de laminină lipsite de colagen și fără activitate de legare a heparinei, dar care se leagă la receptorii membranari pentru laminină, reduce numărul de metastaze. Dimpotrivă, injectarea de laminină intactă împreună cu celulele tumorale conduce la un număr crescut de colonii pulmonare. Aceste rezultate sugerează că legarea celulelor cu laminina este necesară pentru aderența lor la ariile expuse ale membranei bazale capilare. În același sens, celulele cu potențial metastazant important sintetizează mai multă laminină, pe care o reține la suprafață. S-a mai constatat o creștere a producției de colagenază de tip IV, de către celulele expuse la laminină (9, 108, 131). Toate aceste date au permis, așa cum se va vedea la finele acestui capitol, explicarea la nivel molecular a mecanismului metastazelor în care sînt implicate membranele bazale.

5.2. Modificările glicoproteinelor membranare

Interesul cunoașterii afectării glicopeptidelor membranelor este justificat din următoarele motive: a) multe din alterările fenotipice ale celulelor în cadrul carcinogenezei pot fi explicate prin alterările compoziției, structurii sau dinamicii acestora; b) s-a întrevăzut posibilitatea ca modificările glicopeptidelor să se constituie drept marcher universal pentru celulele canceroase; c) o serie de glicoproteine au funcții de importanță particulară la

Scanned with OKEN Scanner

nivelul membranei, îndeosebi în transducția informației la nivel celular (receptori).

Spre deosebire de glicolipide, structura glicoproteinelor din membrană, în ansamblul său și îndeosebi în zona glucidică, este mai puțin cunoscută. De aceea, evaluarea modificărilor care rezultă în cadrul transformării se efectuează prin două metode indirecte: a) prin utilizarea lectinelor; b) prin analiza fracțiunilor glicopeptidice obținute consecutiv acțiunii unor enzime proteolitice asupra celulelor normale și transformate.

a) *Lectinele* au fost inițial cunoscute ca proteine și glicoproteine extrase din plante. Prima proprietate utilă descoperită a fost aglutinarea globulelor roșii *in vitro*, de unde termenul de fitohemaglutinine. Ca urmare au servit la perfectarea cunoașterii grupelor sanguine, care erau aglutinate de tipuri de lectine diferite. S-a dovedit că fiecare lectină posedă o activitate aglutinantă specifică, fixînd reziduurile unui anumit glucid, în cel puțin două locuri din molecula sa. Concanavalina A (con A) din fasole poate, astfel, lega D-glucopiranoza sau D-manopiranoza. Lectina din germenele de grîu (WGA) se atașează la N-acetilglucozamină sau la acidul sialic etc.

Azi se cunosc peste 2500 lectine, mai mult sau mai puțin strict specifice, obținute pornind de la microorganisme, plante sau chiar animale ca melcul, crabul sau peștele. Ele au devenit „unelte" de lucru, sau „sonde" foarte utilizate. Asociate la o substanță opacă la electroni, ele devin vizibile în microscopia electronică exact în locul în care se fixează, indicînd astfel prezența glucidului incriminat în această fixare. Utilizarea în cercetarea oncologică a pornit de la următoarea observație: s-a constatat că majoritatea celulelor de la adultul sănătos sînt mai dificil aglutinabile decît celulele embrionare și cele transformate malign. Totuși, toate celulele au de obicei același număr de locuri de legătură pentru fixarea lectinelor. Reactivitatea lor diferită provine din topografia variabilă a acestor locuri, care pe membrana celulelor transformate sînt mai mobile și se reunesc mai ușor în mici grupuri compacte. Caracterul de aglutinabilitate al celulelor canceroase nu se poate generaliza și depinde de lectina întrebuințată. Excluzînd excepțiile, lectina de ricin aglutinează celulele tumorale și nu are efect pe celulele normale, în timp ce lectina din linte acționează exact invers. Este esențială însă o observație constantă: lectinele nu permit caracterizarea uniformă a celulelor canceroase, dar oferă posibilitatea, în unele cazuri precisă, de a distinge celulele tumorale de celulele normale corespondente.

Lectinele fixate pe oligozaharidele de suprafață nu sînt doar agenți aglutinanți și pot declanșa în celulă o serie de reacții variate, în particular o mitoză. *In vitro*, ele se comportă deci și ca un agent mitogen, în urma unui semnal precis, captat și tradus prin intermediul unei glicoproteine receptoare adaptate.

De o importanță deosebită este utilizarea lectinelor în studiul receptorilor. La celulele maligne și transformate aglutinabilitatea este alterată în diverse alternative implicînd amploarea expresiei, numărul, structura, topografia și dinamica receptorilor de suprafață care leagă lectine (23, 126).

b) *Analiza fracțiunilor glicopeptidice* obținute prin acțiunea unor enzime proteolitice, pornind de la glicoproteinele membranare din celulele normale și transformate, a condus la obținerea mai multor rezultate. Prin cromatografie s-a constatat sistematic că aceste fracțiuni au masa molecu-

Scanned with OKEN Scanner

lară medie ușor superioară în cazul celulelor transformate, față de cele normale (148).

Pentru realizarea acestui tip de experiment, celulele normale și omologele lor transformate sînt cultivate în prezența fucozei marcată cu ^{3}H sau ^{14}C. Utilizarea acestui oligozaharid este preferată datorită catabolizării sale foarte reduse de către celulă, ceea ce va conduce la încorporarea sa îndeosebi în glicoproteine și mai puțin în anumite glicolipide. După o perioadă de incubare celulele sînt spălate și tratate cu o soluție de tripsină diluată, care eliberează glicoproteinele membranare, fără să lezeze celula. După centrifugare se obține un supernatant conținînd glicopeptidele eliberate și un sediment de celule viabile. Glicopeptidele sînt supuse digestiei prin pronază, protează cu spectru larg de acțiune. Apoi, glicopeptidele provenind de la celule normale și transformate sînt amestecate și analizate prin cromatografie, frecvent pe coloană de Sephadex G50. S-a constatat că o serie de glicoproteine provenind din celulele transformate sînt eluate totdeauna înaintea celor cu origine din celulele normale. Această diferență dispare cînd glicopeptidele celulelor transformate sînt supuse în prealabil la acțiunea unei neuraminidaze sau consecutiv hidrolizei acide. Din această constatare rezultă o concluzie foarte importantă: indiferent de tipul celular studiat (uman sau animal) și de agentul de transformare malignă, există o încărcare crescută de acid sialic, care se regăsește deopotrivă la nivelul celulelor transformate, cultivate *in vitro*, cît și la nivelul tumorilor maligne, *in vivo*. Mai mult, glicopeptidele de la nivelul nucleilor, mitocondriilor, lipozomilor și reticulului endoplasmic din celulele transformate prezintă de asemenea, această modificare (22). Alterarea menționată este consecința apariției în cancer a unor glicopeptide de masă moleculară mare.

Un studiu al caracteristicilor separării cromatografice, pornind de la 24 de glicoproteine membranare diferite din celule normale și transformate, a demonstrat că 20 de glicopeptide derivate din glicoproteine prezentau o masă moleculară mai mare decît în mod normal (135).

S-a demonstrat că aceste glicopeptide caracteristice membranelor celulelor maligne lipsesc de la suprafața limfocitelor normale, a limfocitelor prelevate de la bolnavii cu mononucleoză infecțioasă și de la nivelul limfocitelor normale stimulate prin lectine (137). Dimpotrivă, ele sînt prezente la suprafața leucocitelor umane preleucemice, sau prelevate într-un stadiu precoce al bolii. Este deosebit de importantă existența unei relații foarte strînse între prezența acestui tip de glicopeptide la suprafața unei celule și potențialul său oncogen. Această caracteristică, asociată prezenței glicopeptidelor cu masă mare absolut în toate membranele celulelor canceroase, chiar în stadii precoce, a condus la încercarea atestării unui marcher universal detectabil în cancer. În cazul leucemiilor se susține chiar posibilitatea unui diagnostic precoce (138).

Rezultatele menționate par, de asemenea, să probeze că alterarea structurilor glicanice ale glicoproteinelor din membrană reprezintă o modificare fundamentală primară asociată transformării maligne. În alte experimente, utilizarea glicopeptidelor după tratare cu neuraminidază și deci îndepărtarea acidului sialic, a permis punerea în evidență, în celulele transformate, a unei sialiltransferaze capabilă să transfere foarte activ acidul sialic la glicopeptidele desialilate (149).

Scanned with OKEN Scanner

O analiză mai aprofundată a glicopeptidelor rezultate din digestia prin pronază a glicoproteinelor originale din membrană a condus la următoarele observații: a) glicopeptidele de masă mare (≃ 4600 d) ca și omologele lor normale (≃ 3.700 d) reprezintă populații foarte eterogene; b) ele sînt de tip N-glicozidic și par a poseda un nucleu pentazaharidic comun substituit printr-un număr variabil de reziduuri de sialillactozamină; c) glicopeptidele de talie mare posedă astfel mai multe ramificații externe decît glicopeptidele celulelor normale (149).

Alături de glicopeptidele N-glicozidice de tip N-acetillactozaminic au fost caracterizate glicopeptide N-glicozidice care conțin exclusiv manoză și N-acetilglucozamină. Acestea sînt de tip oligomanozidic și corespund glicopeptidelor eluate mai tardiv pe coloană de Sephadex G50. Ele sînt mai abundente la unele celule transformate, față de celulele normale (27). Observația se cere verificată, dar oricum ea poate sugera o analogie cu simplificarea atestată în cazul glicolipidelor.

Rezultante interesante au fost obținute prin fuziunea celulară între diverse celule tumorale și normale. Hibrizii astfel obținuți nu sînt niciodată oncogeni, dar prin segregare genetică, populațiile de celule tumorale reapar. Această metodă permite urmărirea caracteristicilor care rămîn asociate în mod specific la transformarea malignă. Astfel, a fost posibil să se constate că singura modificare constantă asociată transformării afectează o glicoproteină din membrană cu greutatea de circa 100.000 d și punctul izoelectric 4,0. Această glicoproteină, în cazul celulelor transformate fixează mai multă concanavalină A și mai puțină lectină din germen de grîu (WGA) decît aceeași glicoproteină prezentă la celulele normale (20). Pe această bază se afirmă o glicozilare anormală a glicoproteinei de 100 kd și fapt interesant, se încearcă stabilirea unei relații cu receptorul de insulină. Relația este incitată de faptul că după izolarea receptorului pentru insulină s-a constatat că proprietățile acestuia (masă moleculară, punct izoelectric, fixarea lectinelor) sînt comparabile cu ale glicoproteinei de 100 Kd (20).

Glicopeptidele pot fi considerate drept marcher general de tumorigenicitate, ori malignitate a celulelor. Cauzele modificărilor tipice rămîn însă de elucidat.

5.3. Receptorii de la nivelul membranei celulare

Caracterizarea tot mai precisă a numeroase tipuri de receptori a permis obținerea unor date, tot mai numeroase, referitoare la două probleme esențiale: a) rolul receptorilor în procesul de cancerizare b) alterările acestora în cadrul aceluiași proces.

Referindu-ne la prima alternativă, într-o trecere în revistă recentă, de calitate, realizată de A. Stoica și N. Voiculeț (128) se ia în considerare posibilitatea implicării în cancerogeneză a următoarelor tipuri de receptori: pentru factorii de creștere, pentru hormonii steroizi pentru retinoizi și pentru hidrocarburi policiclice aromatice. Rezultatele cele mai convingătoare au fost obținute în cazul receptorilor pentru factorii de creștere, așa cum se va vedea și în subcapitolul cu privire la citoschelet.

În cazul hormonilor steroizi studiul proteinei-receptor a avansat considerabil, deși mai sînt încă necunoscute îndeosebi la nivelul etapelor de trans-

Scanned with OKEN Scanner

ducție. S-au conturat două puncte de interes major, care au generat cercetări multiple: a) steroizii controlează sinteza unor proteine specifice; b) mai multe tumori maligne, în particular neoplasmele glandei mamare și ale prostatei, sînt dependente de hormonii steroizi. Acesta este unul dintre cele mai pregnante exemple ale relației dintre cercetarea moleculară a fenomenelor și progresul practicii medicale. Astfel, s-a probat clar în cancerul de sîn că răspunsul terapeutic depinde de prezența receptorilor citosolici pentru estradiol, la nivelul celulelor tumorale. Cancerele hormonodependente conțin receptori și deci pot fi tratate cu antiestrogeni de sinteză, iar tumorile maligne independente hormonal se caracterizează printr-un număr redus de receptori, ori prin absența acestora (141, 147). Dintre antagoniștii proliferării celulare stimulată de estradiol, cel mai cunoscut este tamoxifenul căruia, deși are renumele inocuității, i se atribuie unele anomalii la nivelul organelor de reproducere (98).

Din datele acumulate pînă în prezent nu rezultă clar mecanismele prin care hormonii intervin în procesul de malignizare. În opinia noastră, un racord al rezultatelor cu rolul de promotor al comunicării intercelulare ar putea conduce la unele clarificări.

În cazul retinoizilor și hidrocarburilor ciclice aromatice se ridică o problemă comună tuturor substanțelor exogene care se leagă „specific" la nivelul membranei și anume, dacă există receptori pentru substanțele respective, sau dimpotrivă legarea se produce pe receptori specifici anumitor molecule endogene.

Retinoizii, dintre care importanți sînt retinolul (vitamina A) și acidul retinoic, posedă o acțiune atestată de inhibare atît a fazei de inițiere cît și a celei de promoție. Punerea în evidență a receptorului specific pentru retinoizi este însă departe de a fi rezolvată.

Cancerigenii chimici au fost intens cercetați, obținîndu-se extrem de multe date utile pentru cunoașterea procesului de cancerogeneză în general. Existența receptorilor, deși plauzibilă prin probe indirecte, rămîne încă ipotetică.

Alterările diferiților receptori, în afara intervenției lor în cancerogeneză, sînt doar în curs de investigare. În principiu, acestea pot fi considerate în primul rînd consecința perturbării globale a matricei lipidice, așa cum a rezultat din secțiunea referitoare la fluiditatea membranei, sau a modificării receptorului însuși, fapt mai greu de demonstrat deocamdată.

6. MODIFICĂRILE CITOSCHELETULUI LA NIVELUL CELULELOR CANCEROASE

Citoscheletul este implicat în determinarea morfologiei și menținerea formei celulare. Modificările oricărui component al său pot afecta răspunsul celulelor la factorii de creștere. Sisteme microtubulilor și al microfilamentelor joacă un rol central în transducția semnalelor exercitate la suprafața celulei de către factorii de creștere, provocînd declanșarea sintezei de către ADN (72). S-a emis ipoteza că microfilamentele, microtubulii și receptorii celulari de suprafață acționează împreună în mecanismul inițierii de către factorii de creștere a mecanismelor de sinteză controlate de ADN. Dacă la celulele normale forma celulară și controlul creșterii sînt strîns cuplate, creșterea celulelor

Scanned with OKEN Scanner

neoplazice este puțin sensibilă la modificările formei celulare (134). S-a sugerat că alterarea morfologiei celulare perturbă transmiterea semnalelor de la suprafața celulară, ca urmare a dezorganizării citoscheletului celulei canceroase. Capacitatea metastatică a melanomului la șoarece crește mult cînd celulele iau forme sferice, pe substrat neadeziv, ea reducîndu-se cînd celulele sînt aplatizate artificial, ceea ce probează că forma celulei are rol în dictarea expresiei fenotipului malign (104).

Forma celulară este determinată de organizarea filamentelor de actină și a proteinelor asociate. Ca urmare, tratarea cu citocalazină B a celulelor produce o rotunjire a celulei prin disrupția microfilamentelor. În mod similar acționează tripsina și plasmina (10). Factorul de creștere epidermică (EGF) și ionoforii pentru Ca^{2+} modifică, de asemenea, forma celulară prin dezorganizarea microfilamentelor.

Date recente atrag atenția asupra rolului fibrelor de stres, alcătuite din mănunchiuri de filamente de actină sau actină-proteine asociate. Acestea lipsesc din celulele care migrează rapid, dar sînt abundente îndeosebi în zona subiacentă membranei plasmatice la celulele imobile sau cu o locomoție redusă. Astfel, fibrele de stres ca un component al citoscheletului creează rezistența la detașarea și deplasarea rapidă a celulelor, ceea ce înseamnă că ele au un rol major în adeziunea celulară, proprietate considerată pînă recent ca depinzînd numai de caracteristicile suprafeței celulare (127). Prin microscopie electronică și tehnici imunochimice a fost demonstrată relația dintre fibronectina matricei extracelulare, vinculină, fimbrină, tulină, plăcile de adeziune și filamentele de actină (84). Se știe că fibronectina din ser sau cea secretată de fibroblaste mediază adeziunea celulelor de cultură pe substrat. Adăugarea de fibronectină la celulele în cultură transformate malign crește adezivitatea celulară la substrat cu o creștere concomitentă a numărului fibrelor de stres. Prin imunofluorescență s-a demonstrat că distribuția fibronectinei la suprafața celulelor în cultură este coliniară cu distribuția fibrelor de stres (58). Aceste constatări completează explicarea la nivel molecular a modului de producere a metastazelor.

În cazul celulelor transformate malign de virusul SV 30 sensibil la temperatură, s-a observat o scădere a filamentelor de actină, de asemenea, funcție de creșterea temperaturii. Rezultate similare au fost obținute în cazul sarcomului Rous (10). Alte cercetări indică faptul că reducerea filamentelor de actină este acompaniată de scăderea fibronectinei. Cînd celulele unei tumori mamare (rama 25) la șobolan sînt stimulate pentru diferențierea *in vitro*, se dezvoltă filamentele de actină și fibronectina de la nivelul suprafeței celulare, tumorigenicitatea scăzînd semnificativ. Același fenomen este prezent în cazul teratocarcinoamelor (144). Coloniile hibride de celule maligne și normale manifestă o tendință la scăderea a fibronectinei și a fibrelor de stres (fig. 5). Totuși, corelația între reducerea fibronectinei, transformarea actinei și capacitatea de proliferare neoplazică a celulelor trebuie interpretată cu prudență. Astfel, la unele celule transformate de virusul aviar se reduc fibrele de stres, dar fibronectina rămîne nemodificată. Mai mulți cercetători compară la celulele epiteliate transformate și netransformate din țesuturi variate, parametrii scăderii fibronectinei, ai reducerii fibrelor de stres și tumorigenicitatea fără a găsi o corelație consistentă (8). O serie de factori pot influența dezvoltarea fibrelor de stres și a fibronectinei. Astfel, butiratul dezvoltă fibrele de stres

Scanned with OKEN Scanner

la hibrizii tumorigeni. În celulele transformate prin iradiere X, fibrele de stres și conținutul în vinculină al plăcilor de aderiune pot fi stimulate prin tratament prelungit cu interferon, fără să se producă însă o acumulare suplimentară de fibronectină. Acidul retinoic restaurează în unele celule neoplazice cuplajul între forma celulară și controlul creșterii (81). Dacă organizarea fibrelor de

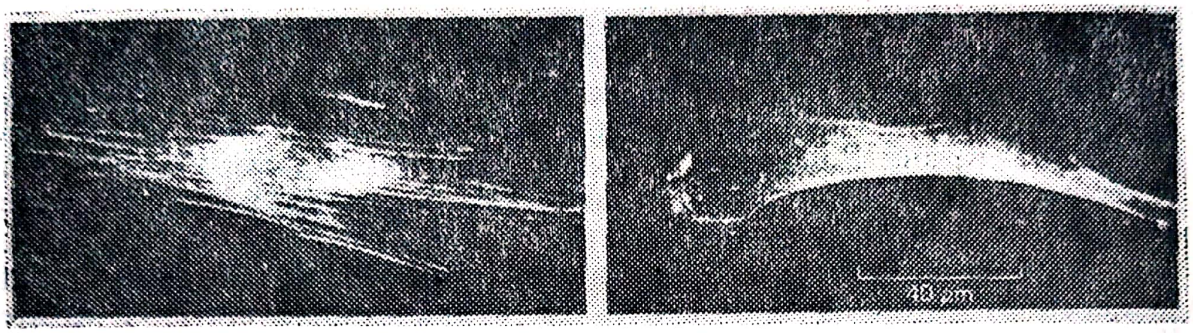


Fig. XI. 5 — Micrografii obținute cu marcheri imunofluorescenți ai actinei: A) fibroblast normal, la care se observă net fibrele de stres; B) fibroblast transformat neoplazic, la care fibrele de stres sînt foarte reduse. (După E. N. Wardle, 1985, preluat din M. Verderame și colab., 1980) (147).

stres ca marcher al tansformării maligne trebuie interpretată în anumite limite, reglarea creșterii celulare prin intermediul citoscheletului este clară.

Pentru înțelegerea mecanismului prin care transformările celulare din cancer modifică citoscheletul, o serie de lucrări recente au abordat relația dintre efectele oncogenelor și intervenția acestora cu sistemul citoscheletic.

Transformările produse de oncogene, denumite global transformare neoplazică, pot fi induse experimental prin microinjecția de oncogenă src purificată în celulele normale (83). Oncogena se obține prin izolare din virusul sarcomului aviar Rous. Acest virus simplu, care provoacă cancer la puiul de găină, nu posedă decît patru gene, dintre care doar gena src este responsabilă de transformare. Cînd această genă este activă celulele se transformă dezvoltîndu-se tumora, iar cînd gena este inactivă celulele apar normale.

Alterarea organizării actinei și a proteinelor asociate se exprimă prin producerea de agregate în formă de rozete, sau în forme denumite C și S. Aceste structuri neobișnuite conțin viniculină și talină. Mecanismele prin care o oncogenă poate dezorganiza fascicule de actină a devenit un subiect de interes deosebit. Acțiunea oricărei oncogene este determinată de proteina pe care aceasta o codifică. Astfel efectele genei src sînt date de proteina p 60 src denumită astfel deoarece are greutatea moleculară 60.000, care a fost izolată, din celulele infectate cu virusul sarcomului Rous. Această proteină are activitate enzimatică particulară, catalizînd fixarea unui grup fosfat pe alte proteine. Ea este, deci, o proteinchinază adăugînd proteinelor asupra cărora acționează grupul fosfat terminal al ATP, principalul purtător de energie al celulei. Anterior descoperirii proteinei p 60 src în 1978 (34), se cunoșteau mai multe proteine de acest tip. Se presupunea de aceea că și proteina p 60 src acționează similar, prin fixarea grupului fosfat pe serina sau treonina proteinelor fosforilate care conțin o grupare OH ce permite fixarea fosfatului. Surprinzător, însă, noua proteinchinază fosforila tirozina, al treilea aminoacid purtător de OH (62). Simultan s-a descoperit că și p 120 abl, proteina trans-

Scanned with OKEN Scanner

formată a unui retrovirus leucemic al șoarecelui fosforila de asemenea tirozina. Fosforilarea tirozinei părea să fie o proprietate caracteristică acestor două proteine oncogenice, dar curînd s-a constatat că toate celulele normale conțin mici cantități de fosfotirozină (tirozină fosforilată), ceea ce semnifică faptul că și celulele normale conțin proteinchinaze cu acțiune asupra tirozinei. Prima enzimă de acest tip identificată într-o celulă normală este chiar produsul genei proto-src (62).

Descoperirea unei activități enzimatice comune a proteinei p 60 src și a omologului său normal ilustrează un principiu important: proteina unei oncogene are aproape întotdeauna o funcție similară cu a omologului său celular. Acțiunea sa cancerizantă este determinată de modificări funcționale minime (fig. 6)

O celulă canceroasă diferă de una normală de același tip prin mai multe caracteristici. De astă dată era clar că fosforilarea tirozinei de la nivelul pro-

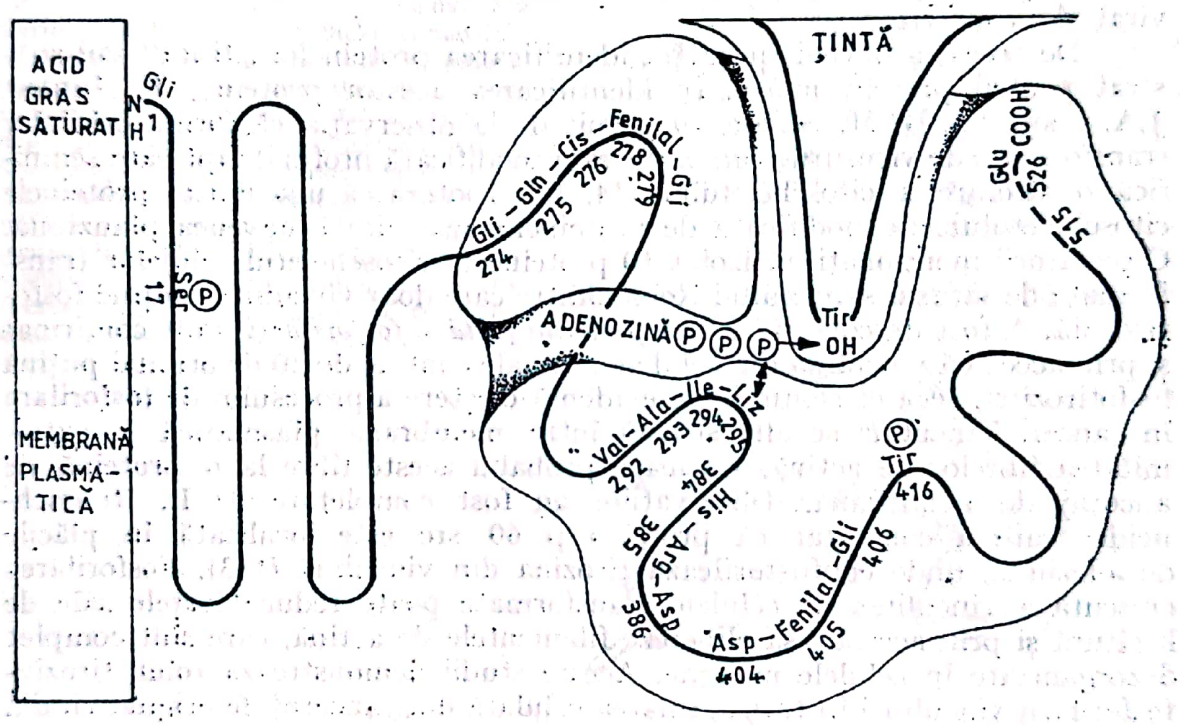


Fig. XI. 6 — Proteinchinaza p 60 arc, alcătuită din 256 aminoacizi, se atașează la membrana plasmatică prin extremitatea sa amino-terminală. Pe schemă se figurează modul în care regiunea sa enzimatică, globulară, ar putea permite transferul celui de al treilea grup fosfat (P) al ATP la nivelul tirozinei din proteina țintă. Lizina, aminoacid, încărcat pozitiv, din poziția 295 este atrasă de al treilea grup fosfat, încărcat negativ. Aminoacizii cu denumirea și pozițiile inicate sînt cei mai stabili. Ei sînt regăsiți în zone analoge ale proteinei p 60 src și în alte 6 proteinchinaze codificate de către oncogene. Principala diferență dintre proteina p 60 src și omologul său normal este următoarea: secvența de 19 aminoacizi ai proteinei normale între poziția 515 și extremitatea carboxiterminală este înlocuită cu o secvență diferită (După T. Hunter, 1984) (62).

teinelor celulare este responsabilă de aceste modificări, prin acțiunea asupra sistemelor complexe de reglare care determină forma celulelor și comandă creșterea lor. Perturbări minore în aceste sisteme ar putea produce starea canceroasă. Nu se știe, totuși, de ce foriforilarea tirozinei nu are aceleași efecte ca fosforilarea serinei și a treoninei.

Scanned with OKEN Scanner

A fost cercetată activitatea de fosforilare a tirozinei pentru toate proteinele codificate de oncogenele cunoscute. S-a ajuns astfel la o constatare interesantă: regiunea din proteinchinază care catalizează transferul grupării fosfat este un segment de 250 aminoacizi situat la una din extremitățile proteinei. Ori, s-a găsit o regiune asemănătoare, cu aproximativ aceeași lungime, în fiecare din cele șase proteine oncogenice care fosforilează tirozina, ceea ce poate conduce la concluzia că aceste proteine au evoluat de la un „strămoș comun" (62).

Fosforilarea tirozinei este un eveniment rar în celulele normale. Nu există decît o fosfotirozină pentru 2000 de grupări fosfat legate la proteine, aproape 90% din grupările fosfat fiind legate la serină și 10% la treonină. Dimpotrivă, în celulele transformate de virus, în care oncogenele produc proteinchinaze specifice tirozinei concentrația în fosfotirozină crește de circa 10 ori. Rezultă clar că activitatea proteinei p 60^{src} se produce în celulă, iar fosforilarea tirozinei din proteinele celulare reprezintă o componentă esențială a mecanismului viral de cancerizare.

De aceea, a devenit necesară identificarea proteinelor „țintă" sau substrat pentru proteinchinaze. În identificarea acestor proteine, T. Hunter, J.A. Cooper și B. M. Sefton au pornit de la observația că forma celulelor transformate de virusurile tumorale este modificată profund fapt care semnifică o alterare a citoscheletului (34, 36). Ipoteza că una dintre proteinele citoscheletului era modificată de proteinchinaza virală devenea plauzibilă. Cercetătorii menționați au izolat 10 proteine în citoscheletul celulelor transformate de virusul sarcomului Rous, dintre care doar vinculina conține fosfotirozină. A fost descoperită astfel *proteina țintă a fosforilării*, fapt confirmat și prin aceea că vinculina din celulele normale conține de 20 de ori mai puțină fosfotirozină, ceea ce semnifică o evidentă creștere a procesului de fosforilare în cancer. Vinculina se află situată între membrana plasmatică și extremitatea fibrelor de actină. Ea leagă probabil aceste fibre la o proteină de ancoraj de membrană. Observațiile au fost completate de L. Rohrschneider care a constatat că proteina p 60 src este localitată în plăcile de adeziune, unde ea fosforilează tirozina din vinculină (113). Fosforilarea crescută a vinculinei în celulele transformate poate reduce forțele sale de legătură și prin aceasta să elibereze filamentele de actină, care sînt complet dezorganizate în celulele maligne. Aceste studii demonstrează rolul tirozin-fosforilării vinculinei în transformarea celulară din cancerul de origine virală. Se pare însă că fosforilarea vinculinei nu este suficientă pentru disrupția filamentelor de actină, deoarece în contactul focal mai sînt implicate și alte proteine (deocamdată necunoscute), a căror fosforilare ar putea avea, de asemenea, un rol. Deocamdată a fost izolată doar talina (133).

Recent (1985) A. Ben-Ze'ev propune, reunind datele prezentate anterior, o reprezentare schematică a bazelor moleculare în oncogeneza virală, în care citoscheletul este prima structură afectată (fig. 7).

Se pare însă că perturbarea „mașinăriei moleculare a celulei" este și mai complexă. Deoarece celulele tumorale au tendința să secrete o cantitate mare de acid lactic au fost investigate cele 11 etape enzimatice ale glicolizei anaerobe. S-a constatat o creștere a activității mai multor enzime ce intervin în glicoliză. Presupunîndu-se că sporirea activității ar putea fi dată de fosforilarea enzimelor prin proteina p 60 src, au fost izolate trei enzime conținînd fosfotirozină: enolaza, fosfogliceratmutaza și lactatdehidrogenaza.

Scanned with OKEN Scanner

Totuşi, deoarece nici una dintre acestea nu limitează viteza glicolizei, se presupune că sporirea vitezei de degradare a glucozei este doar consecinţa creşterii cantităţii substanţei în celulă, ca urmare a captării mult mai rapide de celulele tumorale (62, 63). Dar cercetările au crescut în anvergură cînd celule normale şi celule transformate de virus au fost cultivate *in vitro* în prezenţa fosfa-

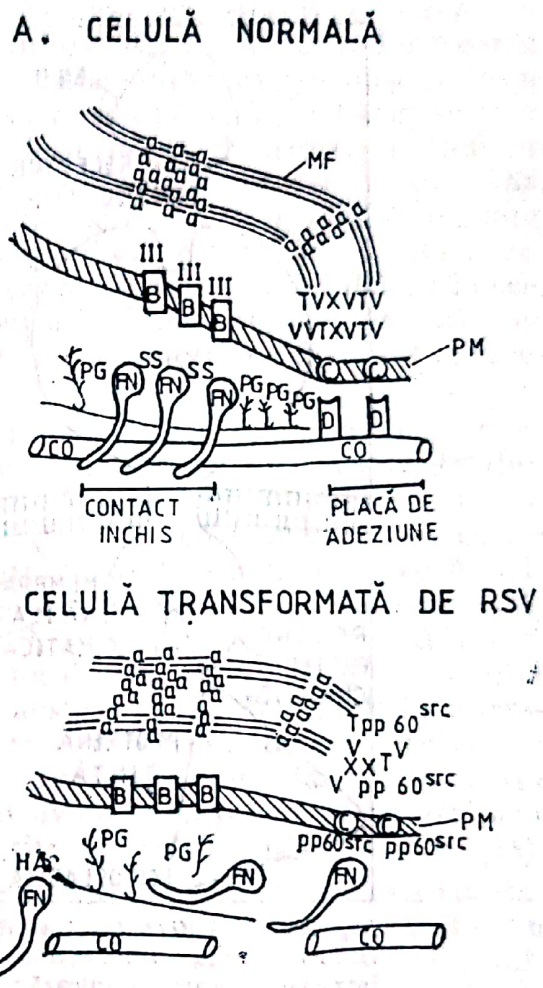


Fig. XI. 7 — Reprezentare schematică a relaţiei posibile dintre citoschelet şi matricea extracelulară, via interacţiuni transmembranare: A) la celula normală; B) la celula transformată de virus. MF = microfilamente de actină; V = vinculină; T = talina; X = componente de contact necunoscute; PM = membrană plasmatică; B şi C = proteine transmembranare; D = component necunoscut; FN = fibroactină; PG = proteoglican; HA = acid hialuronic; CO = = colagen; pp 60 src = proteina 60 a virusului sarcomului Rous (După A. Ben-Ze' ev, 1985) (10).

tului marcat cu fosfor radioactiv. Au putut fi astfel marcate cele circa 500 proteine fosforilate ale unei celule, care sînt puse apoi în evidenţă prin autohistoradiografie. Pentru a distinge din această multitudine de proteine cele cîteva proteine în care tirozina a suferit o fosforilare au fost utilizate baze puternice, ce distrug legătura între fosfor şi serină, dar nu şi între fosfattirozină sau treonină. Astfel a fost descoperită o nouă proteină conţinînd fosfotirozină denumită p 36 (deoarece are masa moleculară 36.000). Ea a fost decelată pentru prima oară în fibroblastele embrionului de pui, transformate de virusul sarcomului Rous şi este considerată în prezent principala proteină ţintă a tuturor proteinchinazelor virale (36). În plus, aceeaşi proteină este fosforilată cînd celulele care prezintă receptori pentru factorul de creştere epidermică (EGF) sînt expuse la EGF (52). Mecanismul răspunsului la EGF prin fosforilarea p 36 nu se cunoaşte dar este posibil ca semnalul de inducere a diviziunii celulare să fie transmis de la suprafaţa celulară spre interiorul celulei prin intermediul

Scanned with OKEN Scanner

fosforilării tirozinei. Proprietatea de inducere a creşterii prin EGF ar putea fi comună celulelor normale şi celulelor transformate prin virusuri oncogene (fig. 8)

Funcţiile p 36 în celulele normale şi posibile alterări din celulele transformate nu sînt cunoscute (10). S-a observat că proteina p 36 este abundentă la nivelul membranelor „în perie" ale celulelor din intestinul subţire, unde este

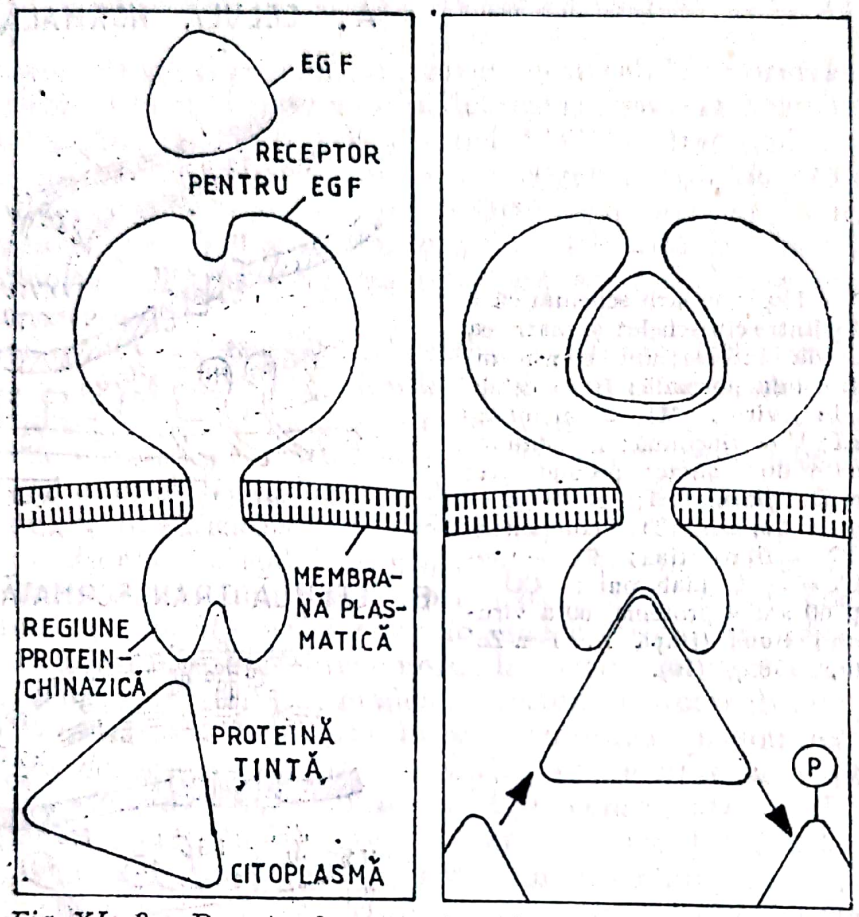


Fig. XI. 8 — Receptorul pentru factorul de creştere epidermică (EGF) prezintă o zonă extracelulară care se leagă de EGF şi o zonă intracelulară care fosforilează tirozina din proteine (figura din stînga). Se presupune că legarea unei molecule de EGF pe receptor schimbă conformaţia acestuia din urmă, astfel încît zona intracelulară devine capabilă să catalizeze fosforilarea unei proteine celulară ţintă (dreapta). Proteinchinazele anumitor oncogene ar putea acţiona asemenea receptorilor pentru EGF, dereglînd creşterea celulelor tumorale.

ancorată prin actina ce penetrează în microvili. De aici supoziţia că ar putea avea un rol structural în celulă. Alţi cercetători au identificat p 36, în asociere cu citoscheletul, în apropierea membranei, asigurînd ancorarea acesteia (62). Membrana celulelor transformate are în general o aparenţă mai rugoasă decît membrana celulelor normale şi probabil ea a suferit şi alte modificări în care este implicată proteina p 36. Distribuţia acestei proteine este foarte asemănătoare cu spectrina noneritrocitară, o proteină cu greutatea moleculară 230000, dispusă de asemenea sub forma unei reţele sub membrană. După extracţia cu detergenţi p 36 rămîne în asociere cu proteine de suprafaţă şi cu proteine din plasmalemă rezistente la detergenţi (76).

Scanned with OKEN Scanner

Cantitatea totală de fosfotirozină într-o celulă transformată de virusul sarcomului Rous este însă superioară sumei cantităților prezente în cele două proteine țintă identificate, vinculina și p 36. Există deci și alte proteine-substrat pentru proteina p 60, src, necunoscute încă.

Cînd se compară celulele transformate prin virusurile care conțin oncogenele src, yes, fjr, abl, fps și fes, se constată că în toate cazurile este fosforilat în celule același ansamblu de proteine: vinculina, proteina p 36 și cele trei enzime glicolitice menționate anterior. Se întărește astfel ideea conform căreia toate virusurile acestui grup transformă celulele printr-un mecanism comun, în care intervine fosforilarea tirozinei. Recent au apărut fapte experimentale noi prin care se arată că proteina p 60 src fosforilează, de asemenea, unul din componenții lipidici principali ai membranei, fosfatidilinozitolul. În acest caz, fosforilarea ar accelera degradarea fosfatidilinozitolului în diacilglicerol, care, la rîndul său modifică o proteinchinază specifică serinei. Se adaugă astfel încă un mecanism prin care proteina p 60 src ar putea altera celulele. Din cele prezentate pînă acum rezultă clar, cel puțin în cazul grupului de oncogene virale, că proteinele aparținînd acestora au un rol cancerigen exercitat la nivelul proteinelor citoscheletului.

În afara alterărilor moleculare ale microfilamentelor de actină, descrise anterior, au fost investigate și celelalte componente ale citoscheletului, microtubulii și filamentele intermediare. Organizarea microtubulilor în transformarea malignă este deocamdată un subiect de controverse. Mai multe studii susțin că microtubulii pot fi implicați în transformarea malignă. Astfel, s-a reușit „inversarea transformării" cu revenirea celulelor la forma normală, după o scurtă expunere la dibutiril-cAMP. Această „inversare a transformării" a fost inhibată de colchicină și citocalazină, ceea ce sugerează rolul microtubulilor în alterările induse de transformarea celulară. Prin microscopie electronică s-a constatat o reducere a numărului de microtubuli în celulele renale malignizate de virusul sarcomului Kirsten, iar cu anticorpi monospecifici pentru tubulină s-a pus în evidență o organizare diferită a microtubulilor în celulele transformate prin virusurile ADN și ARN (21).

Prin tehnici morfometrice de microscopie electronică, recent, s-a constatat că tipuri variate de celule transformate prezentau doar jumătate din numărul de microtubuli comparativ cu celulele normale (157). Aceste rezultate sînt confirmate prin măsurarea conținutului în tubulină, dublu la celulele normale față de celulele maligne (28). A fost detectată o creștere a calmodulinei în celulele transformate. Dacă ținem seama de modularea exercitată în mod normal de calmodulină în asamblarea-dezasamblarea microtubulilor, se poate afirma că o creștere a sa destabilizează microtubulii în celulele transformate, conducînd la reducerea numărului acestora (28). Calmodulina acționează și indirect, prin reglarea nivelului intracelular al tubulinei.

Prin imunofluorescență și microscopie electronică au fost examinate interacțiunile structurale dintre microtubuli și filamentele intermediare. La celulele transformate de virusuri ARN sensibile la temperatură, s-a observat o disrupție rapidă a asocierii microtubuli-filamente intermediare, proces declanșat prin retracția filamentelor intermediare în zona perinucleară, fără nici un efect aparent asupra microtubulilor (6). Este posibil ca și proteina p 60 src să acționeze la nivelul componenților implicați în legarea microtubulilor cu filamentele intermediare, evident, prin fosforilarea reziduurilor de

Scanned with OKEN Scanner

tirozină. Ţinta ar putea fi în acest caz proteina asociată microtubulilor, mai precis fracţiunea MAP2 (132).

În general, caracterele ultrastructurale şi imunologice ale filamentelor intermediare sînt menţinute în cursul transformării neoplazice a celulelor *in vivo* (96). Deşi similare morfologic, filamentele intermediare sînt foarte diferite în ceea ce priveşte compoziţia biochimică, precum şi proprietăţile antigenice. Faptul că în tumorile canceroase celulele îşi menţin, la nivelul filamentelor intermediare caracteristicile tipice ale ţesutului din care provin, s-a dovedit în ultima vreme de mare utilitate în clasificarea tumorilor. Astfel, proteinele filamentelor intermediare au devenit *marcheri specifici* foarte preţioşi în citopatologie (4, 7, 105). Principalele proteine din filamentele intermediare utilizate ca marcheri tisulari specifici sînt menţionate în tabelul III.

TABEL III

Specificitatea tisulară şi tumorală a unor proteine din filamentele intermediare

Tipul proteinei din filamente	Tipul ţesutului	Tipul tumorii identificabile
1 — citokeratine	ţesuturi epiteliale	carcinoame
2 — vimentină	ţesuturi mezehnchimale	limfoame, sarcoame
3 — desmină	ţesuturi musculare	miosarcoame
4 — GFAP (proteină glială acidă)	celule astrogliale	astrocitoame
5 — proteine ale neurofilamentelor	ţesuturi nervoase	unele tumori neuronale

În principiu, citokeratinele sînt specifice celulelor epiteliale, în timp ce vimentina este specifică celulelor mezenchimale, iar desmina este prezentă în celulele de origine musculară.

Tumorile maligne reţin, deci, în filamentele intermediare proteine specifice celulelor lor de origine. Cea mai mare parte a celulelor din tumorile epiteliale şi mezenchimale nu conţin noi tipuri de proteine ale filamentelor intermediare, ca rezultat al transformărilor maligne. Au fost relevate şi unele excepţii (97, 105, 107).

În contrast cu celulele normale, unele celule neoplazice pot să exprime concomitent diferite tipuri de proteine componente ale filamentelor intermediare. Vimentina coexistă cu citokeratina în adenoamele pleiomorfe ale glandei parotide, în carcinoamele adenoide chistice ale glandelor salivare şi pulmonare, în carcinoamele tiroidiene, în mezotelioamele maligne, în carcinoamele celulare renale (tumoră Grawitz) şi în nefroblastoame. De asemenea, celulele canceroase metastatice dezvoltate în cavităţile lichidiene (conţinînd lichid ascitic sau pleural) pot conţine în adiţie la nivelul citoscheletului vimentină (105).

Antiseruri policlonale, preparate împotriva citokeratinei, permit recunoaşterea tuturor ţesuturilor epiteliale incluzînd epitelii scuamoase, epitelii glandulare şi celule mezoteliale. Ca urmare, localizarea histochimică a proteinelor din grupul citokeratinelor este extrem de utilă în caracterizarea,

Scanned with OKEN Scanner

clasificarea neoplasmelor primare epiteliale, precum și în determinarea precisă a apartenenței metastazelor. În acest sens, studii recente confirmă detectarea a 19 tipuri diferite de polipeptide citokeratinice în țesuturile epiteliale umane. Aceste polipeptide nu sînt distribuite uniform în diferitele țesuturi epiteliale, diferitele epitelii avînd profiluri strict distincte, menținute în general atît în tumorile primare cît și în metastaze. Este posibilă astfel o caracterizare mult mai precisă a tumorilor, în special datorită posibilității obținerii în prezent de anticorpi monoclonali specifici diferitelor proteine citokeratinice (9, 106).

Au fost obținute antiseruri și pentru alte tipuri de proteine din filamentele intermediare: vimentină, desmină, GFAP (proteină glială acidă) și neurofilamente. Diagnosticul cu ajutorul acestor marcheri imunohistochimici devine astfel o realitate, în prezent producîndu-se anticorpi monoclonali pentru utilizarea în practica medicală. Chiar aspiratele citologice pot fi caracterizate prin intermediul citokeratinei sau al vimentinei (106).

La sfîrșitul prezentării unor aspecte referitoare la modificările citoscheletului, inevitabil incomplete, putem conchide că rolul acestei structuri decurge din rolul său de transducție a forțelor structurale implicate în controlul creșterii. Factorii de creștere și receptorii lor specifici, își exercită rolul în reglarea fină a creșterii, semnalele fiind transmise de la nivelul biomembranei prin intermediul citoscheletului intracelular și foarte probabil pînă la nucleu. Într-adevăr, cercetări recente au demonstrat o reorganizare rapidă a citoscheletului ca răspuns la unii factori de creștere și promotori tumorali (14, 59). Elucidarea mecanismului prin care acționează proteinele oncogene are o semnificație particulară în înțelegerea alterărilor de transducție a semnalelor destinate creșterii, la celulele canceroase. În viitorul apropiat, acest mecanism molecular, corelat cu alte evenimente de la același gen va putea oferi o explicație mai rațională procesului de cancerizare.

7. MOLECULELE SUPRAFEȚEI CELULARE ȘI METASTAZELE

Metastazarea tumorilor maligne este, probabil, cel mai important eveniment în patogenia cancerului, contribuind în cele mai multe cazuri la sfîrșitul letal. Dacă în tratamentul cancerelor primare s-a realizat un avans considerabil, procesul de metastazare este foarte greu de dominat. Cea mai importantă cale de răspîndire a celulelor tumorale este sistemul circulator. Doar un procent redus de celule se desprinde din tumora primară, iar în eventualitatea accesului în sistemul circulator, o și mai mică fracțiune supraviețuiește. Rezultă deci, că organismul gazdă posedă o serie de mijloace care îi permit să distrugă celulele maligne. În esență sînt implicate mecanismele de apărare proprii organismului și forțele mecanice distructive din sistemul circulator.

Mai multe date experimentale atestă implicarea directă a suprafeței celulare în ansamblul său, în procesul de metastazare. Vom renunța la datele incomplete sau ipotetice, referindu-ne la o modalitate care s-a conturat clar în ultimii ani: relația dintre membranele bazale și activitatea metastatică a unor tumori.

Scanned with OKEN Scanner

Recent, datorită îndeosebi identificării lamininei ca un component esențial al membranelor bazale, clasica „ruptură a bazalei" observată de histologi beneficiază de o explicare la nivel molecular. Datele cu privire la compoziția, dinamica și reînnoirea membranelor bazale, precum și a alterărilor acesteia în carcinoamele invazive, constituie subiectul unor treceri în revistă recente (2, 17, 77, 78, 85, 130).

Modificările membranelor bazale observate în cancerele invazive sînt caracterizate în primul rînd prin discontinuitate. Procesul de ruptură se depistează foarte precoce *in situ* și poate fi pus în evidență prin examen imunocitochimic la microscopul electronic. Fenomenul poate fi explicat pentru fenotipurile celulare particulare, cu un înalt potențial invaziv, printr-un dezechilibru între distrugerea bazalelor (provocată spontan, sau după activare de enzime ca, de exemplu, colagenaza IV și catepsina B) și o biosinteză redusă a constituenților, incapabilă să contrabalanseze fenomenul distructiv.

Pentru explicarea invaziei și metastazelor s-a propus un mecanism „în cascadă" ale cărui evenimente moleculare esențiale sînt următoarele: 1) o atașare crescută și selectivă a celulelor cu înalt potențial invaziv și metastatic la anumiți constituienți ai membranei bazale; 2) urmează o degradare selectivă a acesteia, rezultînd dintr-o cooperare intercelulară și ajungînd la activarea unor enzime secretate sub formă de proenzime, îndeosebi procolagenaza IV plasmin-dependentă; 3) se adaugă alterarea fluidității membranei induse de modificările citoscheletului (77, 78). Procesul în desfășurarea sa concretă este descris ca fiind alcătuit din 4 etape, enumerate în figura 9. Neîndoielnic, descrierea desfășurării moleculare a metastazării în cazul afectării membranei bazale reprezintă doar o alternativă, multiplicitatea

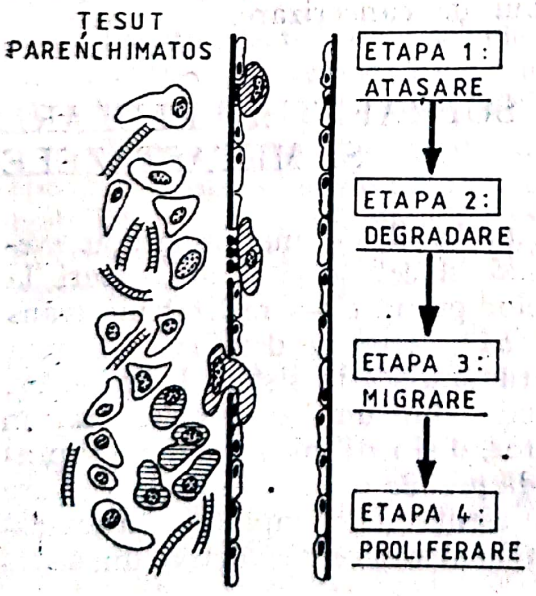


Fig. XI. 9 — Etape în procesul de invazie a celulelor tumorale. Celulele tumorale sînt figurate desprinse din tumora primară și interacționînd, după antrenare în circulație, cu fața luminală a vaselor sanguine de la nivelul țesutului țintă; 1) *atașare* — laminină, membrane bazale; 2) *degradarea membranelor bazale* prin inducția și eliberarea colagenazei de tip IV și a altor enzime; 3) *migrare* — în țesutul țintă; mișcările celulelor tumorale sînt activate de chemoatractanții țesutului țintă; 4) *proliferare* — formarea metastazelor (După C. P. Terranova și colab., 1986) (120).

mecanismelor de metastazare corespunzînd extremei diversități biologice a cancerului. Prin cunoașterea acestui tip de metastazare „în cascadă" se apreciază mai exact prognosticul, ca și orientarea pacienților către secvențe terapeutice adecvate.

Scanned with OKEN Scanner

Alterările suprafeței celulare în cancer sînt mult mai ample decît reiese din datele pe care le-am prezentat.

Unul din fenomenele extrem de importante constă în apariția la nivelul membranei a unor *antigene de suprafață asociate tumorilor*. Prin definiție, acestea reprezintă antigene diferite calitativ sau cantitativ de cele ale celulelor normale. Detectarea lor impune obținerea de anticorpi ori celule imune, la nivelul unor gazde adecvate. Cele mai multe molecule antigenice sînt glicoproteine, identificabile la nivelul feței externe a membranei. Se acceptă că fiecare tip celular și etapă de diferențiere celulară este caracterizată printr-un anumit set de antigene de suprafață, ca expresie a acțiunii selective a genelor (99).

TABEL IV

Antigene de suprafață asociate tumorilor
(După G. Pasternak și colab., 1980) (99)

1 — distincte individual (în tumorile induse fizic și chimic);
2 — antigene virale, sau induse de virusuri;
3 — antigene de diferențiere;
4 — antigene fetale;
5 — alte antigene (încă neidentificate).

Interesul cunoașterii antigenelor este, în afara integrării datelor în expresia procentului de cancerogeneză, și de ordin practic, deoarece o serie dintre acestea pot fi utilizate ca marcheri. În realitate, termenul de „antigen tumoral specific" rămîne interpretabil, deoarece o serie din aceste antigene sînt produsul unor gene normale. În fine, în cazul unor antigene specifice explicația apariției (și deci mecanismul de producere) nu este clară.

Alte modificări ale suprafeței celulare în cancer vizează *enzimele*. Alterarea topografiei acestora, nivelul înalt al proteinazelor, în general, activitatea anormal de intensă a enzimelor acționînd la suprafața celulelor reprezintă constatări frecvente. Datele de acest gen vor deveni mai utile în momentul cînd se va realiza relația precisă cu structurile moleculare.

Schimbări mai mult sau mai puțin tipice se produc în *transportul de ioni și de metaboliți* de la nivelul membranei celulare. Transportul de hexoze și aminoacizi este crescut, uneori chiar avantajos față de celulele normale. Alterarea transportului de ioni, în special prin afectarea conținutului intracelular de Ca^{2+}, poate interfera cu proliferarea și diferențierea celulară. Problema este și în acest caz stabilirea unor relații precise între funcțiile alterate și structurile moleculare corespondente, de asemenea, afectate.

În perspectivă, rămîne de elucidat rolul membranei plasmatice și al suprafeței celulare în ansamblul său în cancerogeneză. Concomitent, nu vor fi ignorate nici modificările atestate ca reflex direct al expresiei fenotipului malign. Aceasta evident, atît datorită utilității în explicarea îndeosebi a unor tulburări clinice din cadrul bolii, ca și pentru căutarea în continuare a unor marcheri utili în diagnosticul cît mai precoce (deocamdată prin mamografie se depistează cancerul cînd tumora are minimum 1 mm diametru, în acest moment ea evoluează de 6—7 ani, conținînd un număr de 10^6 celule!).

Scanned with OKEN Scanner

Este semnificativ faptul că printre marcherii tumorali consacrați se impun tot mai vădit cei având ca sursă modificările suprafeței celulare (119). De asemenea, consecutiv cunoașterii alterării componentelor multiple ale suprafeței celulare se crează premisa încercării corectării acestora și, deci, a unor soluții terapeutice.

Bibliografie selectivă

1. ADAMS S. L., SOBEL M. E., HOWARD B. H., OLDEN K., YAMADA K. M., DE CROMBRUGGHE B., PASTAN I. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3399.
2. ALITALO K., VAHERI A. — Adv. Cancer Res., 1982, 37, 111.
3. ALROY J., PAULI B. U., WEINSTEIN R. S. — Cancer, 1981, 47, 304.
4. ALTMANNSBERGER M., OSBORN M., HÖLSCHER A., SCHAUER A., WEBER K. — Virchows Arch. B. Cell Path., 1981, 37, 277.
5. AUSTIN F., BOONE C. W. — Adv. Cancer Res., 1979, 30, 301.
6. BALL E. H., SINGER S. J. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 6986.
7. BANNASCH P., ZERBAN H., SCHMID E., FRANKE W. W. — Virchows Arch. (Cell Pathol., 1981, 36, 139.
8. BANNIKOV G. A., GUELSTEIN V. I., MONTESANO R., TINT I. S., TOMATIS L., TROYANOVSKY S. M., VASILIEV J. M. — J. Cell Sci., 1982, 54, 47.
9. BARSKY S. H., SIEGAL G., JANNOTTA F., LIOTTA L. A. — Lab. Invest., 1983, 49, 140.
10. BEN-ZE'EV A. — Biochim. Biophys. Acta, 1985, 780, 197.
11. BERENBLUM I. — Sequential Aspects of Chemical Carcinogenesis: Skin, Cancer: A Comprehensive Treatise, (sub red. Backer F. F.), vol. 1, Plenum Publishing Corporation, 1982, pp. 451—484.
12. BERENBLUM I. — în Theories and Models in Cellular Transformation, Academic Press, 1985, pp. 135—153.
13. BERENBLUM I., ARMUTH V. — Biochim. Biophys. Acta, 1981, 651, 51.
14. BOCKUS B. J., STILES C. D. — Exp. Cell Res., 1984, 153, 186.
15. BOJAN O. — Oncogeneza chimică, în Cancerologie, (sub red. Chiricuță I.), vol. I, Editura Medicală, București, 1984, pp. 917—920.
16. BONTWELL R. K. — CRC Crit. Rev. Toxicol., 1974, 2, 419.
17. BOSMAN F. T., HAVENITH M., CLENTJENS J. P. M. — Ultrastruct. Pathol., 1985, 8, 291.
18. BOYNTON A. L., WHITFIELD J. F. — Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1983, 15, 93.
19. BRADY R. O., FISHMAN P. H. — Biochim. Biophys. Acta, 1974, 355, 121.
20. BRAMWELL M. E., HARRIS H. — Proc. R. Soc. Lond. Biol., 1978, 201, 87.
21. BROWN R. L., HORN J. P., WIBBLE L., ARLINGHUS R. B., BRINKLEY B. R. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 5593.
22. BUCK C. A., FUHREN J. P., SOSLAN G., WARREN L. — J. Biol. Chem., 1974, 249, 1541.
23. BURGER M. M. — Federation Proc., 1973, 32, 91.
24. BUTSCHAK G. — în Cell Differentiation, (sub red. L. Nover, M. Luckner, B. Parthier), Springer-Verlag, Berlin, 1982, pp. 597—622.
25. CAIRNS J. — Nature, 1981, 289, 353.
26. CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUCHI K., SANO K., KIKKAWA U., NISHIZUKA Y. — J. Biol. Chem., 1982, 257, 7847.
27. CECCARINI C. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2687.
28. CHAFOULEAS J. C., PARDUE R. L., BRINKEY B. R., DEDMAN J. R., MEANS A. R. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 996.
29. CHATTERJEE S., SWEELEY C. C., VELICIER L. F. — J. Biol. Chem., 1975, 250, 61.
30. CHIRICUȚĂ I. — (sub red.), Cancerologie generală, vol. I, Editura Medicală, București, 1984.
31. CHEN H. W., KANDUTSCH A. A., HEININGER H. J. — Prog. Exp. Tumor Res., 1978, 22, 275.

Scanned with OKEN Scanner

Indice de termeni

A

— acizi graşi, 36—37
— agregarea eritrocitară, 247—250
— alcool, v. etanol
— amiotrofiile spinale progresive, 328—330
— anemii:
  — anemiile hemolitice congenitale, 265—270
  — drepanocitoza, anemia falciformă sau siclemia, 269
  — eliptocitoza ereditară, 267—269
  — hemoliza prin agenţi oxidanţi, 270
  — piropoikilocizoza ereditară, 268
  — reclasificare funcţie de alterările membranei eritrocitare, 260—265
  — sferocitoza ereditară, 265—267
  — stomatocitoza ereditară, 270
— apa şi ionii de la nivelul biomembranelor, 56—57
— arteriopatia cronică obliterantă, 252—253
— ATP-aza (Ca^{2+}), 83—84, 197, 355, 366—367
— ATP-aza (Na^+, K^+):
  — fiziologie, 80—83, 84—85, 197, 224, 286
  — modificări în patologie, 271—274, 312, 315—316, 322—323, 328, 331, 335, 353—355, 379—380, 382—384, 386—387, 400
  — structura moleculară şi mecanismul de funcţionare, 78—80, 223—226.

B

— boala Fabry, 335
— boala Gaucher, 334
— boala Huntington, 335
— boala Kraabe, 334
— boli asociate cu defecte de membrană de natură metabolică, 334—335
— boli în relaţie cu biomembranele (clasificare), 10
— boli virale cu demielinizare, 332
— botulism, 311

C

— canale ionice, 286—290
— cancer:
  — analiza fracţiunilor glicopeptidice, 413—415
  — antigene de suprafaţă asociate tumorilor, 427
  — citoscheletul, 416—425
  — comunicarea intercelulară, 398—400
  — enzime, 427
  — factori de iniţiere şi de promoţie, 396—398
  — factorul de creştere epidermică, EGF, 421—422
  — fibronectine, 110—111, 410—412
  — gangliozide, 408
  — glicolipide, 407—409
  — glicoproteine membranare, 412—415
  — glicosfingolipide neutre, 408
  — lectinele, 413
  — lipidele şi fluiditatea membranei, 402—406
  — marcheri specifici, 424—425
  — metastazele şi membranele bazale 425—426
  — microanatomia suprafeţei celulare, 401—402
  — oncogena src, 418—419
  — proteina p 60 src, 419—420
  — proteina p 36, 421—423

Scanned with OKEN Scanner

— proteinele suprafeței celulare, 410—416
— proteoglicanii și glicoproteinele matricei extracelulare, 410—412
— receptorii celulari, 415—416
— transportul de ioni și metaboliți 427—428
— cell-coat, v. glicocalix
— citoschelet:
— citoscheletul celulelor neuronale, 161—162
— citoscheletul limfocitelor, 159—161
— date generale, 144—146
— filamentele de actină sau microfilamentele, 149—152
— filamentele intermediare, 152—153
— funcțiile citoscheletului, 162—168
— organizarea moleculară și dinamica, 156—159
— patologie, 168—172
— proteinele asociate citoscheletului, 154—155
— relațiile cu plasmalema, 163—165
— rețeaua microtrabeculară, 153—154
— rol în comunicarea intercelulară, 97
— scheletul membranei eritrocitare normal și patologic, 198—207, 258, 265—270
— structura filamentelor și a rețelei microtrabeculare, 147—149
— clatrina, 88
— coeficient de partiție, 15
— colesterol, 35—36, 42—43, 243—245, 260
— compoziția chimică a biomembranelor, 28
— comunicarea intercelulară:
— componentele moleculare, 96—99
— mediile și compartimentele de transfer ale semnalelor, 103—111
— mesageri, mesaje și semnale, 99—103
— modalități, 94—96
— rol, 93
— criofractura în vid (criodecapaj), 207—214

D

— deformabilitatea hematiei, 245—247
— demielinizările, 331—334
— diabet, 253, 272—273
— difracția razelor X, 6
— digitală, toxicitate la vîrstnici, 366—367
— distrofiile musculare progresive, 313—316

E

— epilepsie, mecanisme de membrană, 330—331
— eritrocit:
— agregare, 247—250
— citoscheletul sau scheletul membranei, 198—207
— deformabilitate, 242—247
— formă, 235—242
— membrană, 176—198, 207—235
— modificări clinice ale microreologiei eritrocitare, 251—254
— etanol:
— alterarea enzimelor de la nivelul biomembranelor, 386—387
— compoziția lipidelor membranare, 380—382
— dezorganizarea lipidelor, 384
— efecte asupra lipidelor din membrane, 376—380
— efecte asupra membranelor neuronale, 383—389
— expansiunea membranei, 384
— fluidificarea membranei, 384
— modificările conformaționale ale proteinelor, 385—386
— parametrii biofizici ai membranei 377—379
— proprietățile biochimice ale membranei, 379—380
— proprietățile reologice eritrocitare, 390
— „teoria multimetaboliților", 388—389

F

— fibronectina, 109—111, 410—412
— fluiditate:
— manipularea fluidității, 404—406
— membrană, 59—60
— membrană eritrocitară, 243—247
— strat dublu lipidic, 39—43
— forbolesteri, 398—400

G

— gangliozidoze, 335
— gerovital H_3, 367—368
— glicocalix, 97—99
— glicolemă, v. glicocalix

H

— hipertensiunea arterială esențială, 273—276
— hipertiroidism, 271—272

I

— insuficiența vasculară cerebrală, 253

Î

— îmbătrînire:
— alterări ale acțiunii medicamentelor, 365—368

Scanned with OKEN Scanner

— biomarcheri, 368—370
— compoziția biochimică a biomembranelor, 350—351
— mecanisme imune, 361—363
— modificări ale etapelor postreceptor, 359—361
— modificări ale transportului de ioni, 353—355
— modificările lamelor bazale, 364—365
— modificări ultrastructurale ale biomembranelor, 349—350
— perturbări ale reglării receptorilor, 355—359
— proprietăți biofizice ale biomembranelor, 351—353
— rețeaua evenimentelor moleculare, 347
— teoria de membrană, 348—368
— teorii, 343—347
— teoriile celulare, 344—345
— teoriile modificării organelor, 345—346
— teoriile populaționale, 346—347

J

— joncțiuni intercelulare:
— desmozomi, 101
— hemidesmozomi, 104
— joncțiuni de comunicare, 104—107
— joncțiuni permeabile, 104—107
— joncțiuni impermeabile sau strînse, 104
— tipuri, 103

L

— lamelele sau lamele bazale, 108—109
— laminina, 108—109, 425—426
— leucemia cu celule „păroase", 403
— leucodistrofia metacromatică, 335
— lipidele membranare:
— acizi grași, 36—37
— asimetrie, 46
— colesterol, 35—36
— distribuție, 29
— fosfolipidele, 31—34
— microdomenii lipidice, 44—45
— mișcările lipidelor, 40—43
— sfingolipidele, 34—35
— structura diferitelor clase, 30

M

— matricea extracelulară, 109—111
— mecanisme generale de alterare a suprafeței celulare, 9
— membrană (originea termenului), 14
— membrana eritrocitară:
— alterări secundare unor boli, 270—276
— ankirina sau sindeina, 200—201
— banda 4.1, 201
— banda 4.9, 201
— citoscheletul sau scheletul membranei eritrocitare, 198—207
— clasificarea topografică și funcțională a proteinelor, 191—192
— compoziție biochimică, 178—198
— criofractura în vid (criodecapaj), 207—214
— criterii de clasificare în modificările patologice, 257—260
— date generale, 176—178
— definirea moleculară a anemiilor, 260—270
— enzime asociate cu membrana eritrocitară, 196—198
— fosfolipide, 180—182
— funcții, 206—207
— glicolipide, 183—185
— glicoforina A, 194—196
— glicoproteine „majore", 194
— interacțiunile cu hemoglobina, 254—257
— lipide, 179—188, 259—260
— lipide neutre, 182—183
— membranopatii extrinseci, 262
— membranopatii intrinseci, 261
— metabolismul și reînnoirea lipidelor, 185—188
— modelul gel proteic, 205—206
— „particulele asociate membranei", 210—214
— patologie, 256—276
— permeabilitatea pentru apă și neelectroliți, 217—219
— proprietățile, asocierea și funcția proteinelor, 190
— proteine, 188—198
— proteine intrinseci, 192—196
— rol în deformabilitatea hematiei, 242—247
— rol în determinarea formei hematiei, 235—242
— sistemele de transport eritrocitar de sodiu și variabilitatea lor fiziologică, 226—229
— spectrina, 200—201, 203—206
— transportul activ de Na^+ și K^+, 222—226
— transportul aminoacizilor, 233
— transportul colinei și tetraetilamoniului, 233
— transportul eritrocitar al anionilor, 219—222
— transportul eritrocitar de calciu, 229—231
— transportul glucozei, 231—233
— transportul glutationului, 234—235
— transportul prin membrana eritrocitară, 215—235

Scanned with OKEN Scanner

— membranele în patologia neuromusculară, 296—330
— „membranologie", 12
— miastenii:
  — miastenia congenitală, 309
  — miastenia gravis, 296—309
  — miastenii simptomatice, 310
  — sindromul miastenic indus de D-penicilamină, 309
  — sindromul miastenic Lambert-Eaton, 309—310
— microanaliză nucleară, 263—265
— microviscozitatea membranei, 59—60
— miotonii:
  — aspecte generale, 316—317
  — distrofia miotonică, 318, 323—324
  — miotonia congenitală, 317, 319—322
  — miotoniile experimentale, 324
  — paramiotonia congenitală, 317, 322—323
— modele ale membranei:
  — Colander și Barlund, 15
  — Danielli-Davson, 16—17
  — Gorter și Grendel, 15
  — Green și Perdue, 21
  — Hechter, 20
  — Lucy și Glauert, 21
  — Overton, 15
  — Parpart și Ballentine, 20—21
  — Robertson, 19—20, 21
  — Singer și Nicolson, 57—60
  — Wallach-Zahler, 22, 23
— modelul mozaicului fluid, 22, 57—60

P

— paraliziile paroxistice diskaliemice:
  — paralizia normokaliemică periodică, 325
  — paralizia periodică hipokaliemică familială, 324—326
  — paralizia periodică hipokaliemică tirotoxică, 325, 326
— potențial de acțiune:
  — baze ionice, 288—290
  — conducerea în fibrele nervoase amielinice, 290—291
  — conducerea saltatorie în fibrele nervoase mielinizate, 291—292
  — perioadă de latență, 288—289
  — postpotențial negativ, 289—290
  — postpotențial pozitiv, 290
  — repolarizarea rapidă, 289
— potențial de repaus, baze ionice, 286—288
— proteinele de la nivelul membranei:
  — date generale, 46—47
  — mobilitate, 55—56
  — proteinele extrinseci sau periferice, 48—49
  — proteinele intrinseci, 49—55
  — tipuri, 47—48
— pseudohipoparatiroidism, 272
— psihoze maniaco-depresive, 273

R

— receptorii membranari:
  — agoniști-antagoniști, 113—114
  — AMP-ciclic, 117, 118, 119—122, 123, 126, 127
  — analiza datelor rezultate din tehnicile de legare, 133—136
  — calciul liber din citoplasmă, 125, 129
  — conceptul de receptor, 112—113
  — cuplarea mesagerilor secunzi cu răspunsul celular, 126—129
  — date generale, 111—113
  — diferențierea receptorilor, 116
  — dinamica receptorilor, 114—115
  — evaluarea cantitativă a receptorilor, 129—136
  — fosfatidil-inozitol, 122—124, 127—129
  — GMP-ciclic, 117, 118, 121—122, 126—127
  — interacțiunile ligand-receptor, 113—114
  — mecanismele răspunsului celular, 116—129
  — sistemele de mesageri secunzi, 118—119
  — tehnici de legare a agoniștilor pe receptori, 129—133
  — tipuri de efecte hormonale asupra mesagerilor secunzi, 119—125
— receptorul colinergic nicotinic (AchR), 300—305
— receptorul insulinic, 136—137, 140—141
— receptorii opiacei, 137—139
— receptorul pentru TSH, 140

S

— scleroza multiplă, 332—333
— sinapse:
  — caractere morfofuncționale generale, 292
  — caracteristici funcționale, 293
  — etapele fundamentale ale transmiterii sinaptice, 293—296
— sindromul Landry-Guillan-Barré, 333—334
— sindromul Niemann-Pick, 334
— spectrină, 200—201, 203—206, 258
— stratul dublu lipidic:
  — asimetrie, 46
  — fluiditate, 39—43
  — formare spontană (autoorganizare), 38
— suprafață celulară, 9

Scanned with OKEN Scanner

T

— tehnici de studiu al biomembranelor (enumerare), 23—24
— tensiune superficială, 16
— tetanos, 311
— transportul prin biomembrane:
  — aminoacizi, 85
  — canale ionice, 73, 75—76
  — date generale, 63—65
  — difuziunea apei prin membrane, 70—72
  — difuziunea facilitată, 73—75
  — difuziunea simplă, 68—73
  — difuziunea simplă mediată de proteine, 70—73, 75—76
  — difuziunea simplă prin stratul bilipidic, 68—70
  — endocitoza, 88—90
  — exocitoza, 90
  — fagocitoza, 89—90
  — fluxul de protoni, 85—86
  — glucoza, 84—85
  — ionofori, 72—73
  — pinocitoza, 88—89
  — pompa de calciu, 83—84
  — pompa de sodiu și potasiu, 78—83
  — tipuri de transport, 65—68
  — transcitoza, 90—91
  — translocarea de grup, 86
  — transportul activ, 76—86
  — transportul activ primar, 77—83
  — transportul activ secundar, 84—86
  — transportul direct al macromoleculelor, 86
  — transportul pasiv, 68—76
  — transportul prin vezicule, 87—91

V

— veninuri, 311—312
— viscozitatea singelui, 250

Scanned with OKEN Scanner

REDACTOR DE CARTE: **PROF. DR.TEODORESCU EXARCU**
TEHNOREDACTOR: **ŞTEFĂNACHE MIHAI**

BUN DE TIPAR; 27 XII 1987.
FORMATUL: 16/70×100.
HÎRTIE: SCRIS I A 70×100/56.
COLI TIPAR: 27,5.

TIPARUL EXECUTAT: c. 277
I. P. INFORMAŢIA
STR. BREZOIANU NR. 23—26

Scanned with OKEN Scanner